UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
APR 20 '53

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne · Bern · Zürich · Genève-Pasadena

Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

KARL SLOTTA: Zur Chemie der Schlangengifte 81

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

H. R. VAN DER VAART: The Content of Certain Spherical Polyhedra for any Number of Dimensions 88
M. F. MILLSON, R. ROBINSON, and A. F. THOMAS: Notes on the Alkaloids of *Picralima* 89
E L. ELIEL: The Origin of Steric Hindrance in Cyclohexane Derivatives 91
R. MEIER und B. SCHÄR: Weitere Untersuchungen über Bakterienchemotaxine 93
M. EVENARI and G. STEIN: The Influence of Light upon Germination 94
F. H. SCHWARZENBACH: Die Abhängigkeit der Bulbillenbildung bei *Poa alpina vivipara* von Photoperiodismus und Frost 96
S. OSAWA and Y. OOTA: Growth and Pentose Nucleic Acid Content of Bean Embryo 96
N. MILLOTT: Colour Pattern and the Definition of the Spezies, *Diadema antillarum* Philippi 98
H. ENGLÄNDER, A. GISELA JOHNEN und W. VAHS: Untersuchungen zur Klärung der Leistungsspezifität verschiedener abnormer Induktoren bei der Embryonalentwicklung der Urodelen 100
M. G. LEVINE: Dynamic State and Half Life Time of Human Serum Cholinesterase 101
J. B. LOEFER and R. B. MEFFERD, JR.: Host Resistance to Tumor Implantation, its Alteration and Relationship to the Individual Metabolic Pattern 103
D. BAGDY and T. SZILÁGYI: Mammalian Specificity of Fibrinogen 104
G. P. TOGNI und O. MEIER: Über das Verhalten der Serumcholinesterase des Pferdes bei der Papierelektrophorese 106
K. A. P. EDMAN: Action of Ouabain on ATP.-induced Contraction of Glycerol-extracted Muscle Fibers 107
H. J. BEIN: Zur Pharmakologie des Reserpin, eines neuen Alkaloids aus *Rauwolfia Serpentina* Benth. 107
H. LÜLLMANN und W. FÖRSTER: Über die Möglichkeit des Vorkommens doppelgipfliger Häufigkeitsverteilungen bei homogenem Material 110
C. G. BERNHARD, E. BOHM, and I. PETERSÉN: New Investigations on the Pyramidal System in *Macaca mulatta* . . 111
S. DIJKGRAAF: Über das Wesen der optomotorischen Reaktionen (Disputandum) 112
F. S. SJÖSTRAND: A New Microtome for Ultrathin Sectioning for High Resolution Electron Microscopy (Pro Laboratorio) 114

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Dirichlet's Principle, Conformal Mapping, and Minimal Surfaces. By R. Courant (Interscience Publishers, New York, 1950) (Ref. K.-F. Moppert) 115
Physical Geography. By Arthur N. Strahler (John Wiley & Co., New York, 1951) (Ref. D. Brunnschweiler und G. C. Amstutz) 116
Lehrbuch der Röntgendiagnostik. Von H. R. Schinz, W. E. Baensch, E. Friedl und E. Uehlinger (Verlag G. Thieme, Stuttgart, 1951/52) (Ref. H. Lüdin) 116

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum Progressus: M. HAÏSSINSKY: La place des éléments transuraniens dans le système périodique 117
Congressus 120

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natura, science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît e 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 32.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 38.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la parution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant.
Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhæuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und der Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.
Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 32.–, im Ausland sFr. 38.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 35 Tage vor Erscheinungstermin, das heisst am 10. des Monats für den folgenden Monat.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA esce a 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice.
L'abbonamento annuo è di fr. 32.– per la Svizzera; all'estero fr. 38.–.
I prezzi vanno intesi valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–, ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 32.–; other countries fr. 38.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 49800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia IX/3

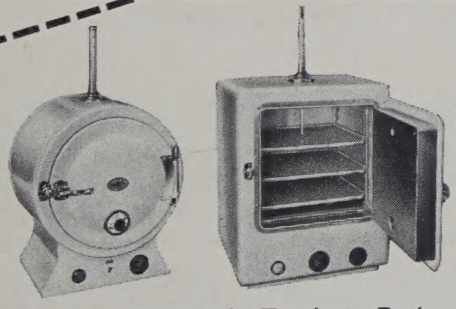
Verlag Birkhäuser AG., Basel
CIBA AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Salvis AG., Luzern
Sandoz AG., Basel
Schwitter AG., Basel
Trüb, Täuber & Cie., Zürich
H. Wild, Heerbrugg

Bessere mikrophotographische Aufnahmen

Eine Ausrüstung, die sich durch ihre hohe Leistung in der Praxis bewährt hat: WILD-Mikroskop M 10 BK mit Aufsatzkamera WILD und der leistungsfähigen Niedervolt-Mikroskopierlampe WILD mit Verbindungsschiene. – Ausführliche Beschreibung im Katalog Mi 511.

WILD
HEERBRUGG

Elektrische Wärmegeräte
für Laboratorien



Elektrische Trocken-, Brut- und Sterilisierschränke

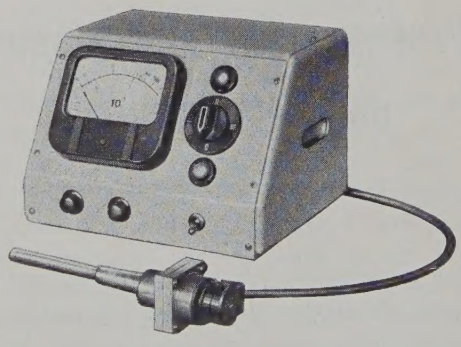
Salvis
SALVIS AG. Luzern-Emmenbrücke
Fabrik elektrischer Apparate

MUBA-Stand 1289 Halle V

Gerätebau-Anstalt GAB **Balzers (FL.)**

Vakuum-Messgeräte

kontinuierlich anzeigend zwischen
10^{-5} bis 1 mm Hg



Vollkommen unempfindlich gegen Lufteinbrüche in eingeschaltetem Zustand. Einstellzeit max. 2 Sek. Eingebauter Umschalter für Anschluss von 4 Messzellen. Gerät auch als „Leak-detector" verwendbar.

Verkaufsorganisation

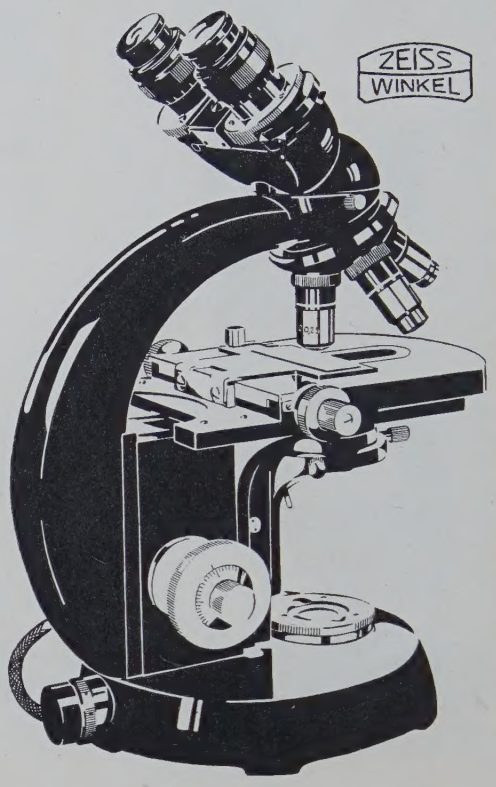
Trüb, Täuber & Co. AG. Zürich
Fabrik elektr. Meßinstrumente und wissenschaftl. Apparate

*

NEUES **ZEISS**-WINKEL STANDARD-MIKROSKOP GF 525

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie**
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Grosser Kreuztisch mit koaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrösserungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**
- **Neue Achromate und Neofluare mit dezimalgeometrischer Abstufung der Vergrösserungen**



Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & Co
BAHNHOFSTR. 40 *Zürich*
TEL. (051) 23 97 73

Eidgenössische Technische Hochschule und Universität Zürich

Auf den 1. Oktober 1953 ist die ordentliche

Professur für Mineralogie und Petrographie

(Doppelprofessur beider Hochschulen)

neu zu besetzen. Interessenten mit grosser wissenschaftlicher Befähigung und pädagogischer Erfahrung sind gebeten, ihre Bewerbungen (mit Lebenslauf und wissenschaftlichen Veröffentlichungen bis spätestens 7. April 1953 dem Präsidenten des Schweiz. Schulrates, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich 6, der auch weitere Auskünfte erteilt, einzureichen.

ARCHIV DER MATHEMATIK

Archives of Mathematics – Archives de mathématiques

Herausgegeben in Verbindung mit dem Mathematischen Forschungsinstitut in Oberwolfach von H. KNESER und W. SÜSS

Beirat: G. Bol, E. Bompiani, P. Ten Bruggencate, J. Dieudonné, Ch. Ehresmann, H. Görtler, H. Hadwiger, H. Hopf, W. Magnus, T. Nagell, Chr. Pauc, J. Radon, K. Reidemeister, J. A. Schouten, H. Seifert, E. Sperner, E. Stiefel.

Redaktion: H. BILHARZ, Universität Würzburg

Erscheint seit 1948; jetzt ab Band 3 (1952) regelmässig in 6 Heften von je ca. 80 Seiten Umfang. Format 17 × 24 cm. Abonnementspreis pro Band sFr. (DM) 60.–, Einzelheft sFr. (DM) 12.–.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL / STUTTGART

EXPERIENTIA

Vol. IX - Fasc. 3 Pag. 81–120 15. III. 1953

Zur Chemie der Schlangengifte

Von KARL SLOTTA, São Paulo, Brasilien[1]

Die Schlangengifte sind in bezug auf ihre *physiologischen Eigenschaften* weitgehend untersucht. Bei Naturstoffen, die auf Nerven, Muskeln, Zirkulation, Blut, Herz, also praktisch auf alle Teile des Körpers stärkste Wirkungen ausüben, ist das nicht verwunderlich. So hat man die Gifte der verschiedensten Schlangen auf alle möglichen Substrate, wie Eiweiss, Blutkörperchen, Azetylcholin, Adenosintriphosphat usw., einwirken lassen und ihre enzymatischen Wirkungen festgestellt. Ob es sich bei den auf diese Weise beobachteten Wirkstoffen um Enzyme im strengen Sinne des Wortes handelt, oder ob wir Toxine und Enzyme unterscheiden müssen, sei dahingestellt.

Jedenfalls sind die vielleicht wichtigsten Wirkstoffe der Schlangengifte die folgenden:

1. *Neurotoxine*, die vor allen Dingen die Atmung lähmen.
2. *Lezithinasen* oder *Hämolysine*, die aus Lezithin das Lysolezithin bilden, das die Blutkörperchen auflöst.
3. *Koaguline*, die in verschiedener Weise in das System der Blutgerinnung eingreifen.
4. *Proteasen*, die nicht nur normale Eiweisskörper abbauen, sondern von ihnen Substanzen, wie Histamin, ablösen und auch aus ihnen physiologisch hochwirksame Polypeptide abspalten (wie etwa das Bradikin), die dann Schockwirkungen auslösen.
5. *Kardiotoxine*, die den Herzmuskel zum Stillstand bringen.
6. *Hämorrhagine*, die Ödeme, Hämorrhagien und schliesslich Nekrosen bewirken.

Was nun die *chemische Aufklärung* der Schlangengifte angeht, so stehen wir noch vollkommen am Anfang. Wir glauben zwar heute zu wissen, dass alle diese Wirkstoffe Eiweissnatur haben. Ob aber jede der physiologisch nachgewiesenen Wirkungen einem chemisch einheitlichen Protein zukommt, ist schon sehr strittig. Weiterhin ist es bisher nur in zwei Fällen geglückt, kristallisierte, physiologisch hochaktive Proteine zu isolieren. Wenn auch die Kristallisation bei einem Eiweißstoff noch nicht den Beweis seiner Einheitlichkeit darstellt, so ist sie doch zumindest ein Schritt auf diesem Wege.

Die Schwierigkeiten der chemischen Aufklärung der Schlangengifte sind mannigfaltig. Zunächst einmal ist es nicht leicht, genügende Mengen *frischen Giftes* zu erhalten, denn die oft in ziemlich roher Weise entnommenen und getrockneten Gifte sind meistens schon verändert. Dann ist die Abtrennung der einzelnen, sehr ähnlichen Eiweisskomponenten mehr eine Kunst als eine Wissenschaft.

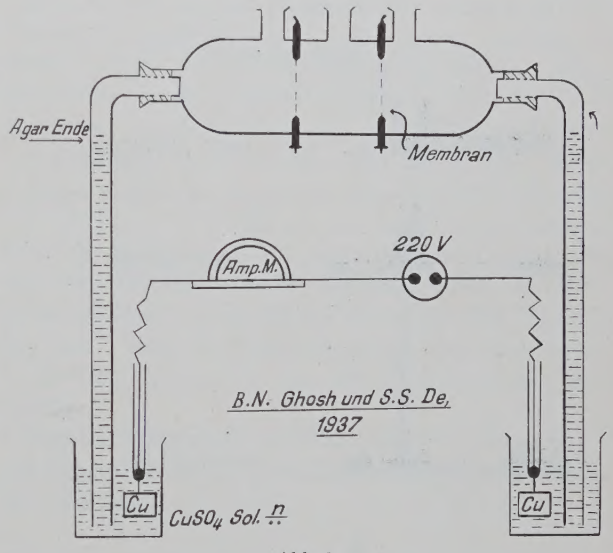


Abb. 1.

Die chemisch am besten untersuchten Schlangengifte sind die aus der Gruppe der Klapper- und der Brillenschlange, also einer Viper und einer Natter, um die biblische Bezeichnung zu gebrauchen. Die moderne zoologische Systematik hat die Einteilung und die Bezeichnungen der Gruppen, Arten und Spezies der Schlangen öfters geändert, aber man kann sagen, dass die *Klapperschlangen* (zum Beispiel *Crotalus terrificus terrificus*, das heisst die brasilianische Art) *Viperiden* (auch Crotaliden genannt) sind, die zu den Solenoglypha gehören. Diese Gruppe umfasst die Schlangen, die einen vollkommen geschlossenen Giftkanal in den mit den Giftdrüsen verbundenen Maxillarzähnen und bewegliche Fänge haben.

Die *Brillenschlangen*, das heisst vor allem die indischen Naja-Arten, sind *Colubriden* (auch Elapiden genannt), die zur Gruppe der Proteroglypha gehören und deren nicht bewegliche Giftzähne einen noch nicht so vollkommen geschlossenen Kanal aufweisen. In Asien wurden 27 verschiedene Gattungen (111 Spezies) von

[1] K. SLOTTA, Caixa Postal 4790, São Paulo (Brasil).

Colubriden gezählt, während in Amerika vor allem Viperiden mit 4 Gattungen (50 Spezies) vorkommen.

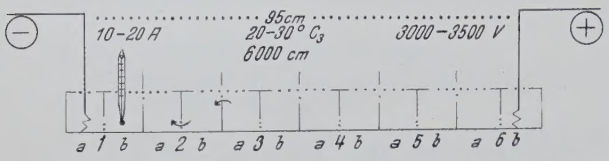
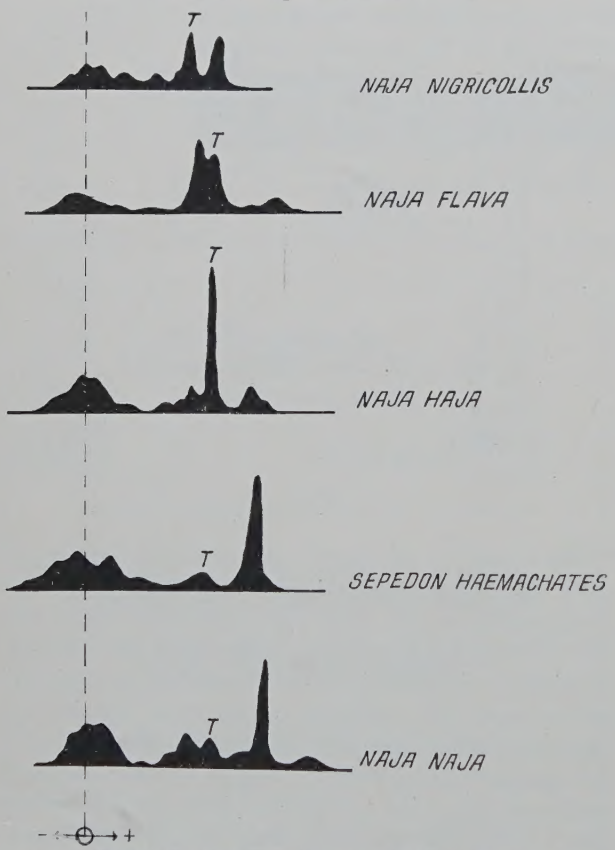


Abb. 2. F. MICHEEL, 1937.

Im übrigen hat diese Systematik, die sich auf äussere Merkmale stützt, für eine chemische Einteilung der Schlangengifte nur sehr beschränkte Bedeutung. Die Gifte der verschiedensten Giftschlangen sind wohl in ihrer physiologischen Wirkung und somit ihrer chemischen Zusammensetzung verschieden, aber es handelt sich dabei mehr um quantitative als qualitative Unterschiede.

Abb. 3. Elektrophorese der Gifte von



Nach A. POLSON, F. J. JOUBERT und D. A. HAIG.

In den Jahren vor dem Zweiten Weltkriege wurden wesentliche Trennungsergebnisse mit der *Elektrodialyse*[1] und *Kataphorese*[2], besonders am Gift der Brillenschlange in Indien und in Deutschland, erzielt (Abb. 1 und 2).

[1] B. N. GHOSH und S. S. DE, Ind. J. Med. Res. *24*, 1175 (1937).
[2] F. MICHEEL, H. DIETRICH und G. BISCHOFF, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *249*, 160 (1937).

Erst nach dem Kriege erschienen die ersten Veröffentlichungen, die die *Elektrophorese* zur Aufklärung der Gifte heranzogen. Man erhielt so zumindest ein Bild über die Zahl und die Menge der einzelnen Komponenten verschiedener Colubriden- und Viperidengifte, die bei verschiedenem pH, verschiedener Ionenstärke und Konzentration untersucht wurden. Betrachtet man die erhaltenen Diagramme verschiedener *Colubridengifte*, wie die von *Naja flava*, *Naja naja* usw., so sieht man, dass diese Gifte zum mindesten aus sieben bis acht elektrophoretisch verschiedenen Proteinen bestehen[1] (Abb. 3). Interessant ist dabei, dass die neurotoxische *und* hämolytische Wirkung immer gemeinsam bei der mit *T* bezeichneten Komponente gefunden wurde. Dasselbe konnte auch bei einem *Viperidengifte*, nämlich von *Crotalus t. t.* aus Argentinien, nach elektrophoretischer Trennung festgestellt werden[2] (Abb. 4).

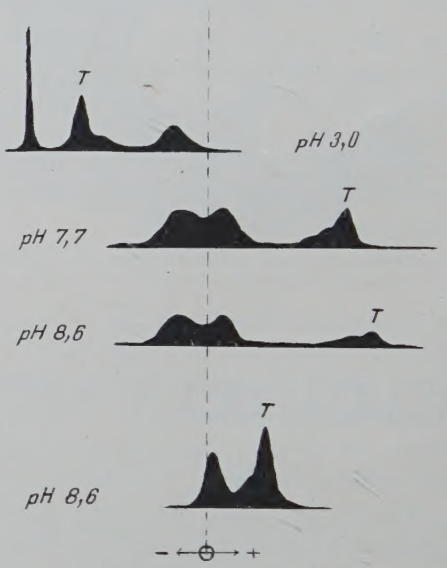


Abb. 4. Elektrophorese von Klapperschlangengift. Nach J. M. GONÇALVES und A. POLSON.

Eine neuere elektrophoretische Untersuchung frischen Giftes der brasilianischen Klapperschlange (*Crotalus t. t.*) zeigte auch das Vorhandensein von mindestens sieben verschiedenen Eiweisskörpern[3] (Abb. 5).

Die Elektrophorese ist bisher nur für die analytische Aufklärung der Schlangengifte benutzt worden. Die *präparative Trennung* der einzelnen, verschieden geladenen Eiweissubstanzen wurde bisher mit Hilfe der Elektrophorese noch nicht durchgeführt. Die bescheidenen Erfolge, die in der Isolierung einiger Giftkomponenten erzielt worden sind, verdanken wir deshalb, ausser der genannten Elektrodialyse und Kataphorese, den alten Fällungsmethoden der Eiweisschemie. So ist

[1] A. POLSON, F. G. JOUBERT und D. HAIG, Biochem. J. *40*, 265 (1946).
[2] J. M. GONÇALVES und A. POLSON, Arch. Biochem. *13*, 253 (1947).
[3] Für die Durchführung dieser Versuche bin ich G. HÖXTER, Instituto Butantan, São Paulo, dankbar.

es besonders in Indien geglückt, aus dem *Najagift vier der aktiven Substanzen* auf das 15–20fache anzureichern und eine davon in kristallisierter Form zu gewinnen.

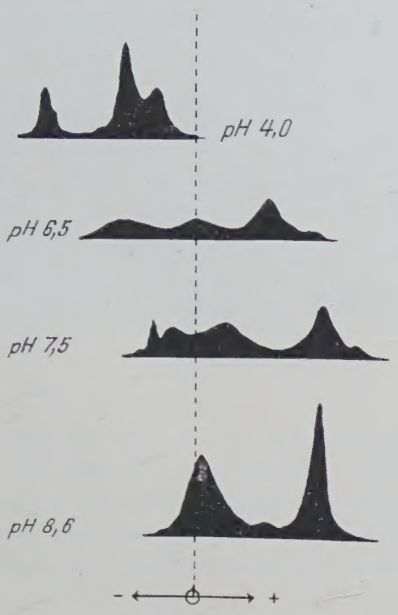


Abb. 5. Elektrophorese von Klapperschlangengift (Butantan).

Nach den erwähnten elektrophoretischen Bestimmungen schien es, als ob das atmungslähmende Neurotoxin und das Hämolysin dieser Colubridengifte chemisch dieselbe Substanz sei. Das ist aber sicher nicht der Fall. Das *Neurotoxin* der Brillenschlange ist ein *Polypeptid* vom Molekelgewicht 1500–4000[1] und einem isoelektrischen Punkt nahe pH = 11[2]. Es gibt ein Pikrat und Hydrochlorid[3]. Man wäre geneigt, es als ein Histon bzw. Protamin anzusehen, wenn es sich nicht von solchen Stoffen grundlegend durch seinen hohen *Zystin*gehalt von 20,6%[1] unterschiede, worauf noch zurückzukommen ist. Auffallend ist, dass die in ihm vorhandenen Mengen der drei Diaminosäuren Histidin, Lysin und Arginin im Verhältnis von 1:2:4 stehen sollen, wie es auch für das Thymushiston gefunden wurde[4].

Nun ist ja bekannt, dass Protamine und Proteine mit saurem isoelektrischem Punkt salzartige Verbindungen eingehen können. So bildet Insulin (i.P. = 5,3) mit Protaminen (i.P. = 12), im Verhältnis von 1:10 vermischt, eine Verbindung, deren i.P. bei 7,2 liegt[5]. Etwas Ähnliches könnte zwischen dem kleinmolekularen, stark basischen Neurotoxin des Najagiftes und dem viel höhermolekularen, saureren Hämolysin vorliegen. Nur ist der saurere Charakter des Hämolysins nicht so stark ausgeprägt wie der des Insulins, und wohl deshalb gelingt es verhältnismässig leicht, in schwach saurer Lösung (pH = 2,8–5,8) mit Fällungen durch Natriumchlorid und -sulfat oder Ammoniumsulfat in der Nähe der Halbsättigung Neurotoxin vom Hämolysin zu trennen.

Das *Hämolysin* fällt aus, während das kleine, basischere Neurotoxin in Lösung bleibt. Weitere Reinigung wird dann durch Adsorptionsverfahren und Kataphorese erzielt, bis das *Neurotoxin* fast rein und im Vergleich mit dem Rohgift 17mal so giftig vorliegt. Es ist wichtig, festzustellen, dass in zwei vollkommen getrennten Arbeitskreisen, in Deutschland[1] und in Indien[2], ungefähr dieselbe Anreicherung erzielt worden ist, ohne dass dieses *Polypeptid* zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Dies ist nur bei der *Lezithinase* (= *Hämolysin*) des Najagiftes geglückt, die vor 11 Jahren erstmals in feinen, spitzen Nädelchen erhalten wurde[3]. Das Molekelgewicht wurde zu 31900[4], der i.P. zu 8,55 bzw. 8,61[5] bestimmt. Aus dem Gift zweier verschiedener Abarten der *Naja naja* (oder, wie sie auch heisst, *Naja tripudians*) hergestellt, besassen diese Kristalle dieselbe hämolytische Wirksamkeit von 3360 Lezithinaseeinheiten je Milligramm, während die Hämolysinkristalle aus dem Gift einer anderen indischen Schlange (*Bungarus fasciatus*) nur genau die Hälfte der Wirksamkeit besassen[6]. Zum Vergleich sei gesagt, dass das Neurotoxin vom *Crotalus t.t.* nur 133 Lezithinaseeinheiten besitzt.

Die *Gesamtanalyse* des kristallisierten Hämolysins aus Najagift erscheint der des kristallisierten Crotoxins sehr ähnlich:

	Crotoxin	Hämolysin
C	50,71%	48,66%
H	6,41%	6,21%
N	15,86%	15,92%
S	4,03%	3,88%
Molekulargewicht	30 000	35 200
Isoelektrischer Punkt	4,71	8,55–8,61
Zystin	13,20	11,60
Methionin	1,36	3,62
Tyrosin	12,00	4,34
Tryptophan	2,70	1,81

Auf Grund einer quantitativen Bestimmung der im Hämolysin enthaltenen Aminosäuren soll es aus 36 Arginin-, 32 Zystein- (?), 24 Histidin-, 12 Lysin-, 8

[1] F. Micheel und F. Jung, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *239*, 217 (1936).
[2] B. N. Ghosh und S. S. De, Ind. J. Med. Res. *24*, 1175 (1937).
[3] H. Wieland und W. Konz, Sitz.-Ber. der Bayr. Akad. Wiss. *1936*, S. 177.
[4] B. N. Ghosh und D. K. Chaudhuri, J. Indian Chem. Soc. *20*, 22 (1943).
[5] H. Hageborn und Mitarbeiter, J. Amer. Med. Assoc. *106*, 177 (1936).

[1] F. Micheel, H. Dietrich und G. Bischoff, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *249*, 160 (1937).
[2] B. N. Ghosh und S. S. De, Ind. J. Med. Res. *25*, 779 (1938).
[3] S. S. De, Sci. a. Culture *6*, 675 (1941).
[4] S. S. De, J. Indian Chem. Soc. *21*, 307 (1944).
[5] S. S. De, J. Indian Chem. Soc. *21*, 292 (1944).
[6] S. S. De, Ann. Biochem. Exp. Med. *2*, 237 (1942).

Methionin-, 8 Tyrosin- und 3 Tryptophanresten aufgebaut sein. Auf die Angabe des Zystin- bzw. Zysteingehalts[1] wird noch zurückzukommen sein.

Weniger als über das Neurotoxin und Hämolysin ist bisher über die Chemie des *Kardiotoxins* und der *Cholinesterase* aus diesen Najagiften bekannt, die beide auch aufs 15–20fache angereichert werden konnten. Vom Kardiotoxin wurde das Molekelgewicht zu 46200[2] und der i.P. zu 8,2[3] bestimmt und seine Empfindlichkeit gegen Ultraviolettbestrahlung festgestellt[4]. Die Cholinesterase hat einen i.P. von 5,55 bis 5,90[5], stellt also den von vier bekannteren Substanzen der Colubridengifte die sauerste dar.

Die indischen Autoren haben sich aber nicht nur mit den Colubridengiften beschäftigt, sondern auch das Gift der dort häufigen Viper, der *Russel-Viper* oder *Daboia*, untersucht. Es gelang ihnen, das Koagulin, eine nur in Vipergiften in grösserer Menge vorkommende Komponente, abzutrennen. Als sie das Gift bei pH = 5 der Elektrodialyse unterwarfen, reicherte es sich im Anodenraum an[6]. Die Reinigung des *Neurotoxins* aus demselben Gift bis auf das 7–8fache ergab eine Substanz, die einen i.P. von 5,8 bis 5,9 hatte[7] und ausser der neurotoxischen noch hämolytische Eigenschaften besass[8].

Obgleich es in Brasilien besonders viel Viperarten gibt, ist über die Chemie ihrer Gifte noch fast gar nichts bekannt. Besonders gilt das leider von dem Gift der in Brasilien häufigsten Schlangen, der *Bothrops*arten, die auch, ebenso wie die Crotalusarten, Solenoglypha sind. Da die proteolytische und koagulierende Wirkung dieser Gifte parallel läuft, ist aus neueren Arbeiten sehr wahrscheinlich gemacht, dass diese beiden Wirkungen von demselben Protein ausgeübt werden[9]. Aber die chemische Isolierung dieser oder anderer Komponenten ist bisher kaum ernsthaft versucht worden. Das wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass durch Elektrophorese im Gift von *Bothrops jararaca* 11 verschiedene Eiweisskomponenten festgestellt wurden, während das Gift von *Crotalus t.t.* «nur» 7 zu enthalten scheint[10].

Das *Klapperschlangen*gift ist also ein verhältnismässig einfaches Gemisch von Proteinen und Polypeptiden, und das ist wohl mit ein Grund dafür, dass wir über das Gift von *Crotalus t.t.* schon erheblich besser Bescheid wissen. Auch dieses Viperidengift besitzt eine Komponente, die wir *Koagulin* nennen, die sowohl koagulierend wie proteolytisch wirkt. Koagulin besitzt *Albumin*charakter und konnte aufs 10fache gegenüber dem Rohgift angereichert, aber bisher nicht kristallisiert werden[1].

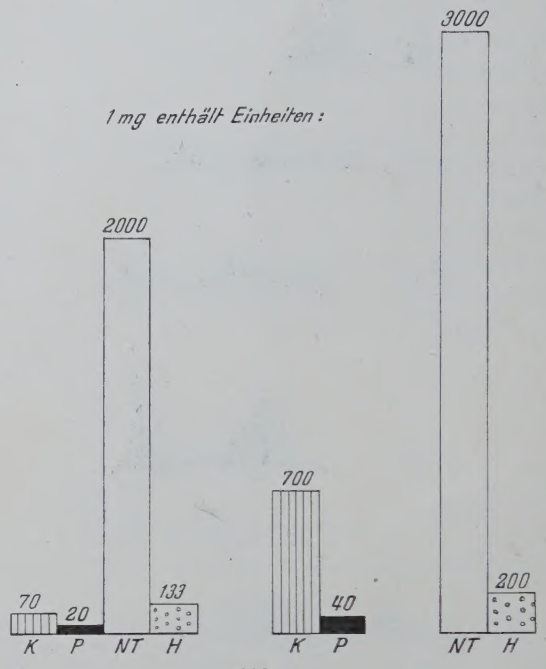


Abb. 6.

Crotalus-t.-t.-Gift (getrocknetes, rohes Klapperschlangengift) | Koagulin (gereinigt) | Crotoxin (kristallisiert)

K = Koagulase-, P = proteolytische, NT = neurotoxische, H = hämolytische oder Lezithinaseeinheiten.

(Zur Definition siehe: K. SLOTTA und G. SZYSZKA, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 258 [1938]).

Dies gelang nur mit einer zweiten Komponente, die die neurotoxische und hämolytische Aktivität des Rohgiftes in sich vereinigt, dem *Crotoxin*. Dieses *globulin*ähnliche Protein kristallisiert bei Halb- bis Zweidrittelsättigung (Abb. 6), mit Ammonsulfat aus der durch Hitzekoagulation von unwirksamen Bestandteilen befreiten Lösung in schönen, quadratischen Plättchen aus (Abb. 7). Es besitzt ein Molekelgewicht von 30000, einen i.P. von 4,71 und ist neurotoxisch und hämolytisch nur 50% wirksamer als das rohe Gift[2]. Das erscheint besonders wichtig im Hinblick auf die Tatsache, dass sich fast alle anderen chemisch bearbeiteten Komponenten aus diesen und anderen Schlangengiften aufs 10–20fache anreichern liessen. Das Crotoxin ist also nicht nur die für die Wirkung des Giftes ausschlaggebende, sondern auch mengenmässig die Hauptkomponente des Klapperschlangengiftes.

Durch Papierchromatographie seines Hydrolysates wurde festgestellt, dass es aus *18 Aminosäuren* zu-

[1] S. S. DE, J. Indian Chem. Soc. *22*, 10 (1944).
[2] N. K. SARKAR, J. Indian Chem. Soc. *24*, 61 (1947).
[3] N. K. SARKAR, J. Indian Chem. Soc. *24*, 227 (1947).
[4] N. K. SARKAR und S. R. MAITRA, Ann. Biochem. Exp. Med. *46*, 87 (1946).
[5] D. K. CHAUDHURI, Sci. a. Culture *8*, 5, 1942 (1944); Ann. Biochem. Exp. Med. *6*, 9 (1946).
[6] B. N. GHOSH, S. S. DE und P. R. RAY, Sci. a. Culture *4*, 738 (1939).
[7] B. N. GHOSH und S. S. DE, Sci. a. Culture *3*, 297 (1937).
[8] B. N. GHOSH, S. S. DE und D. P. BHATTACHARJEE, Indian J. Med. Res. *26*, 753 (1939).
[9] B. JANSZKY, Anais do Instituto Pinheiros *14*, 51 (1951).
[10] Nach HÖXTER und MUNGIOLI, zitiert von W. H. A. SCHÖTTLER, Bull. World Health Organ. *5*, 294 (1952).

[1] K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Nature *142*, 213 (1938).
[2] K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Memorias do Instituto Butantan *12*, 505 (1938).

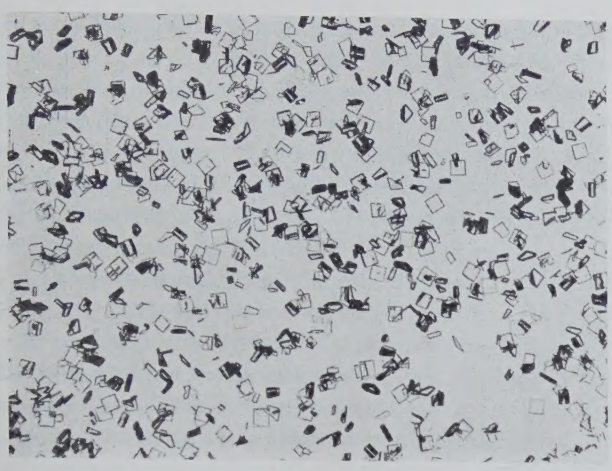


Abb. 7.

sammengesetzt ist. Es war dazu nötig, besondere Verfahren für den Nachweis des Histidins, Valins und der beiden Leuzine anzuwenden[1] (Abb. 8). Von allen 18 Aminosäuren sind bisher nur Zystin zu 13,2% und Methionin zu 1,36% quantitativ genau[2] und Tyrosin zu 12,0% und Tryptophan zu 2,7% mit einiger Sicherheit bestimmt worden[1].

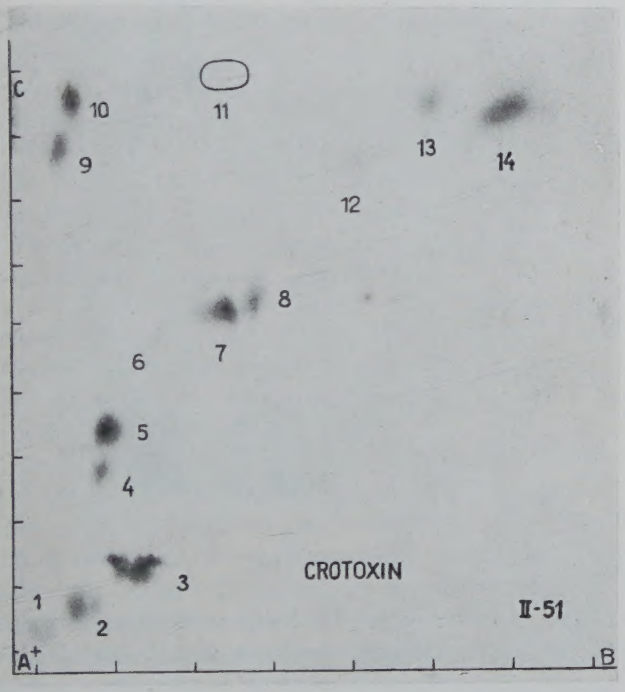


Abb. 8. Zweidimensionales Chromatogramm von 350 γ Crotoxinhydrolysat, bei + auf Whatmanpapier Nr. 1 aufgetragen.

In Richtung $A \rightarrow B$ mit Butylalkohol + Essigsäure,
In Richtung $A \rightarrow C$ mit Phenol + Wasser chromatographiert.
Mit Ninhydrin entwickelt.

1 Zystin, *2* Asparginsäure, *3* Glutaminsäure, *4* Serin, *5* Glykokoll, *6* Threonin, *7* Alanin, *8* Tyrosin, *9* Lysin, *10* Arginin, *11* Prolin, *12* Valin + Methionin, *13* Phenylalanin, *14* Leuzin + Isoleuzin.

Schon bald nach der Entdeckung des Crotoxins zeigte sich, dass die –S–S–Bindungen in den Zystinmolekülen des Crotoxins von ausschlaggebender Wichtigkeit für seine Wirksamkeit sind. Neuerdings wurde eine weitere, sehr bemerkenswerte Tatsache gefunden: Die neurotoxische Wirksamkeit des Crotoxins wird stark vermindert, wenn man durch chemische Reagenzien einen wesentlichen Teil der aromatischen oder aliphatischen Hydroxyl-, Karboxyl-, Imidazol-, Indol-, Amino-, Amido- oder Guanidylgruppen verändert[2]. Crotoxin ist von allen auf diese Weise bisher untersuchten physiologisch aktiven Proteinen das *empfindlichste*. Lässt man zum Beispiel Jod oder Formaldehyd unter gleichen Bedingungen auf Insulin und Crotoxin einwirken, so sinkt die Aktivität des Insulins nur etwas, während die neurotoxische Wirkung des Crotoxins schon verschwunden ist.

Ist dieses so empfindliche Molekül nun aber wirklich eine chemisch reine Substanz? Die Fällung mit *Ammonsulfat* in steigenden Sättigungsgraden spricht dafür. Als die in Lösung bleibenden Proteinmengen gegen den Sättigungsgrad von Ammonsulfat in ein Koordinatensystem eingetragen wurden, ergab sich im Versuch mit kristallisiertem Crotoxin eine Gerade[3] (Abb. 9).

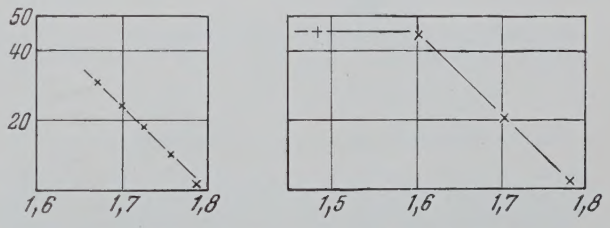


Abb. 9. Ammoniumsulfatfällung von Crotoxin. Abszissen: log des Sättigungsgrades an Ammoniumsulfat in Prozenten der Vollsättigung ausgedrückt. Ordinaten: Milligramm Crotoxin in Lösung.

Mit der *Ultrazentrifuge*[4] und durch *Elektrophorese*[5] wurde Einheitlichkeit festgestellt. Also alle drei Kriterien, die man normalerweise für die Bestimmung der Einheitlichkeit von Proteinen anwendet, gaben ein positives Resultat.

Nur zwei indische Autoren zweifelten[6]. Sie sättigten bei pH = 7,0–7,2 eine Lösung von Crotalusgift mit Kochsalz und liessen sie über Nacht bei 6° stehen. Der Niederschlag enthielt dann 8–10% der anfänglichen hämolytischen und nur 2–2,5% der toxischen Aktivi-

[1] K. Slotta und J. Primosigh, Memorias do Instituto Butantan *23*, 51 (1951).
[2] K. Slotta und W. Forster, Memorias do Instituto Butantan *12*, 513 (1938).
[1] H. und J. Fraenkel-Conrat, Biochim. Biophys. Acta *5*, 98 (1950).
[2] H. und J. Fraenkel-Conrat, Biochem. Biophys. Acta *5*, 98 (1950).
[3] K. Slotta und H. Fraenkel-Conrat, Memorias do Instituto Butantan *12*, 505 (1938).
[4] N. Gralen und The Svedberg, Biochem. J. *32*, 1375 (1938).
[5] Ch. H. Li und H. Fraenkel-Conrat, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1586 (1942).
[6] B. N. Ghosh und S. S. De, Nature *143*, 380 (1939).

tät. Also ist vielleicht das niedrigmolekulare Neurotoxin fast vollständig in Lösung geblieben, während das hochmolekulare Hämolysin zu 10% ausfiel? Man muss zugeben, dass der einmalige, vor 13 Jahren gemachte Versuch nicht sehr überzeugend ist, aber er gibt trotz seiner Primitivität doch zu denken.

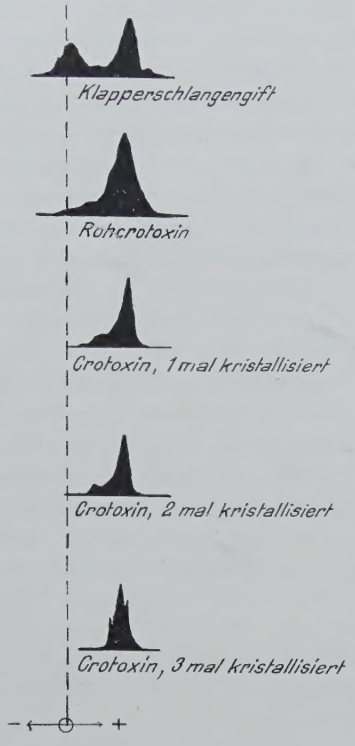


Abb. 10. Elektrophorese von Crotoxin pH 6,0 (Butantan).

Neuere Methoden ergaben nun folgendes: Wenn man Crotoxin der chromatographischen Verteilung mit Cellosolve-Ammonsulfat-Wasser auf «Hyflo» unterwirft, so bekommt man für das amorphe Crotoxin eine Kurve, die auf drei Substanzen schliessen lässt, während die Kurve des kristallisierten Crotoxins manchmal klarer, manchmal weniger klar einen Doppelbuckel erkennen lässt[1]. Alle Fraktionen des Giftes werden bei diesem milden Verfahren schon ganz ungiftig und zum Teil unlöslich.

Vor kurzem wurde frisch hergestelltes und kristallisiertes Crotoxin mehrfach, ebenso wie früher, umgelöst. Dies geschah durch Aufnehmen des Proteins in einprozentiger Essigsäure bei 55° und Versetzen der Lösung mit einprozentigem Pyridin, so dass die Lösung dann dem pH des i.P. = 4,71 möglichst nahe kommt. Nach jedem Umlösen wurde das Crotoxin bei pH = 6 der *Elektrophorese* unterworfen, und es ergab sich, dass die erhaltenen Kurven immer weniger der Gaußschen nahe kamen, je öfter das Crotoxin umgelöst worden war[1] (Abb. 10).

Nun wurden mit demselben, zweimal umgelösten Crotoxin in einer anderen Apparatur bei höherem pH (= 6,9) Kurven erhalten (Abb. 11), aus denen man auf die Einheitlichkeit dieses Proteins schliessen kann[2].

Aber die öfters bei pH = 6,0 durchgeführten Elektrophoreseversuche, die deutlich auf eine, wenn auch geringfügige, Spaltung des Moleküls hindeuten, legen – besonders auch im Hinblick auf die bei Najagift gefundenen und vorher erwähnten Tatsachen – folgenden Gedanken sehr nahe: Sollte nicht schon in ganz schwach saurer Lösung zu einem vielleicht sehr kleinen Teil eine langsame Abspaltung von gewissen Polypeptidgruppen stattfinden? Ist das Crotoxin vielleicht die gut kristallisierende, salzartige Verbindung eines sauren Proteins, des Hämolysins, mit mehreren basischen Polypeptidgruppen, denen die neurotoxische Wirksamkeit zukommt?

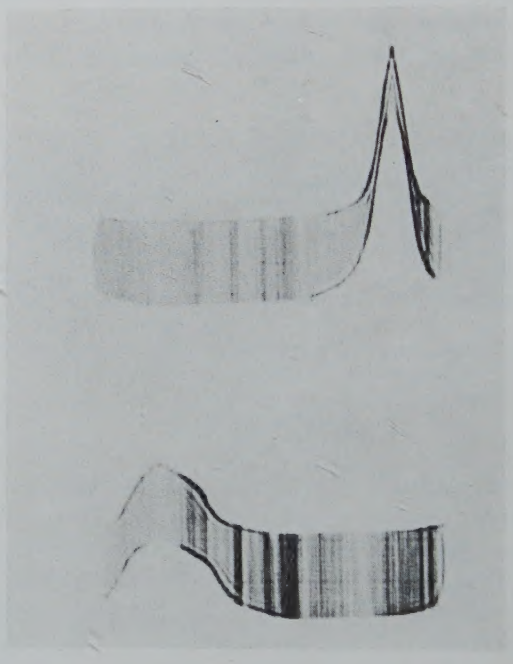


Abb. 11.

Als versucht wurde, die *Endgruppen* des Crotoxins zu bestimmen, ergaben sich Resultate, die auch dafür sprechen, dass Crotoxin aus zwei Proteinarten zusammengesetzt ist. Mit Fluordinitrobenzol behandelt, wurde ein wasserunlösliches und ein wasserlösliches Dinitrobenzolderivat im ungefähren Verhältnis von $^2/_3$: $^1/_3$ erhalten. Sie wurden gesondert hydrolysiert und die durch Dinitrobenzol substituierten Aminosäuren quantitativ bestimmt. Aus dem unlöslichen Produkt wurde mehr als doppelt soviel Lysin gefasst als aus dem lös-

[1] Nach einer persönlichen Mitteilung von H. FRAENKEL-CONRAT, der die Methode von A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, Biochem. J. *49*, 215 (1951), benutzte.

[1] Für die Durchführung dieser Versuche bin ich G. HÖXTER, Instituto Butantan, São Paulo, dankbar.

[2] Ich danke CH. H. LI für die freundliche Übermittlung seiner Versuche und deren Interpretierung.

lichen. Lysin ist natürlich nicht endständig. Als endständige Aminosäuren wurden kleine Mengen einer noch nicht definierten Aminosäure und Serin gefunden[1]. Vorläufig kann man sich aus diesen Ergebnissen noch kein Bild machen. Fest steht nur, dass durch diese Umsetzung aus Crotoxin zwei sehr verschiedene Substanzen gebildet werden, die, wie zu erwarten, beide physiologisch inaktiv sind.

Immer wieder sehen wir, wie leicht es ist, die Aktivität dieser physiologisch so hoch aktiven Proteine, besonders die des Crotoxins, zu zerstören. Es erhebt sich aber auch immer wieder die noch interessantere Frage, *warum* ein solches Eiweissmolekül überhaupt so *giftig* ist. Das Gesamtmolekül, nur aus den bekannten Aminosäuren aufgebaut, ist für die Wirkung wichtig; weder seine Proteinbindungen noch seine sauren, neutralen oder basischen Seitengruppen dürfen geschädigt werden[2]. Aber das erklärt noch nicht unsere Hauptfrage. Sehr wahrscheinlich sind es die Schwefelbindungen, die in bestimmter Stellung und Oxydationsstufe diese physiologisch starke Wirkung ausüben.

In den Schlangengiften hat man nur zwei schwefelhaltige Aminosäuren gefunden: *Zystin* (bzw. Zystein) und *Methionin*. Im Crotoxin wurden 94,8% des Gesamtschwefels als 13,2% Zystin und 1,36% Methionin erfasst. Eine neurotoxisch vollwirksame Fraktion aus Bothropsgift enthielt 5,73% Zystin und 1,08% Methionin, womit sich der Schwefelgehalt vollständig deckt[3]. Im kristallisierten Hämolysin aus Najagift wurden 11,6% Zystein und 3,62% Methionin gefunden, was nach dem festgestellten Gesamtschwefel (3,88%) zu hoch wäre[4] und sich nicht mit den Angaben deckt, wonach im Najarohgift aller Schwefel in Form von 13,6% Zystin gefunden wurde[5]. Aber diese analytischen Differenzen sind nicht das Wesentliche. Für die physiologische Wirksamkeit scheint am wichtigsten, wieviel, in welcher Form und wo Zystin und Zystein im Molekül eingebaut sind.

Nach Folin mit Phosphorwolframsäure, nach Sullivan mit Naphthochinonsulfosäure und nach Bärnstein mit Jod bestimmen wir direkt nur Zystein, das entweder im Protein als solches vorhanden war oder erst aus dem Zystin bei der Hydrolyse mit Salzsäure und Ameisensäure bzw. mit Jodwasserstoff gebildet wurde. Da in den Schlangengiften die Reaktionen mit Nitroprussidnatrium und Phosphorwolframsäure negativ ausfallen, so liegt es zunächst nahe, das in den Hydrolysaten gefundene Zystein als den Gehalt der Gifte an *Zystin* anzunehmen. Es wäre natürlich aber auch möglich, dass dieses Zystein nur zum Teil aus dem Zystin des Proteins entstanden ist und dass im Gift schon gewisse Mengen als Zystein vorgelegen haben.

Wir müssen heute in den Proteinen «leicht reagierende» *Thiolgruppen*, die mit Natriumnitroprussid und Ferrizyanid ohne weiteres reagieren, von anderen unterscheiden, die wir «träge» nennen wollen. Diese reagieren nicht damit, aber zum Beispiel mit Jod. Ausserdem existieren noch «maskierte» Thiole, die erst reagieren, wenn die Wasserstoffbindungen in dem Protein zerrissen werden, wie es bei der Denaturierung geschieht. Im Hämolysin aus Najagift scheinen sehr viele leicht reagierende Thiolgruppen vorzuliegen, denn mit Jod, Wasserstoffsuperoxyd und Ferrizyanid tritt Inaktivierung ein, die mit Schwefelwasserstoff und Natriumzyanid wieder rückgängig gemacht werden kann[1]. Ob im Neurotoxin aus Najagift neben –S–S–Brücken auch «träge» und «maskierte» Thiolgruppen vorhanden sind, kann man wohl noch nicht sicher sagen. Im Crotoxin scheinen sie keinesfalls vorhanden zu sein. Die irreversible Inaktivierung des Hämolysins und auch des Kardiotoxins durch Ultraviolettbestrahlung beruht dagegen wahrscheinlich auf noch anderen Schädigungen dieser Proteine[2].

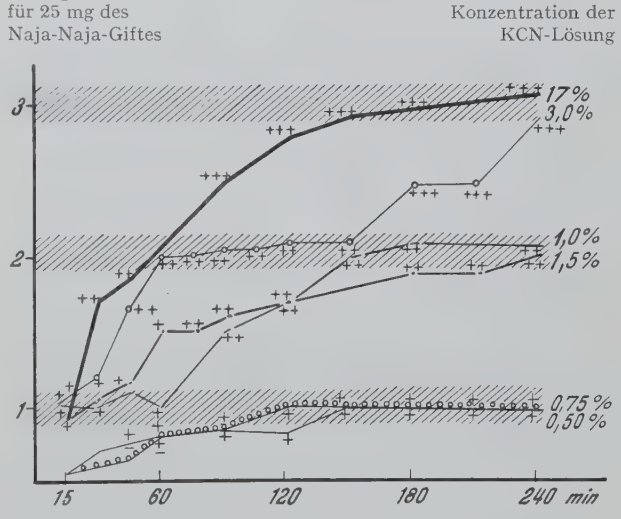


Abb. 12.

Sicher ist, dass nicht nur die Thiolgruppen in physiologisch wirksamen Proteinen, sondern auch die *–S–S–Brücken* ausserordentlich verschiedene Reaktionsfähigkeit haben. Diese –S–S–Brücken reagieren im Crotalusrohgift sehr leicht: Mit der 20fachen Menge Zystein bei pH = 7,6 wird die Giftigkeit bei Zimmertemperatur innerhalb von 24 h zum grössten Teil beseitigt[3], während im gleichartigen Versuch die Giftig-

[1] Nach einer persönlichen Mitteilung von H. Fraenkel-Conrat, der die Methode von A. J. P. Martin und R. R. Porter, Biochem. J. *49*, 215 (1951), benutzte.

[2] H. und J. Fraenkel-Conrat, Biochim. Biophys. Acta *5*, 98 (1950).

[3] K. Slotta und W. Forster, Memorias do Instituto Butantan *12*, 513 (1938).

[4] S. S. De, J. Indian Chem. Soc. *22*, 10 (1944).

[5] K. Slotta, W. Forster und H. Fraenkel-Conrat, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 1623 (1938).

[1] S. S. De, Ann. Biochem. Exp. Med. *2*, 237 (1942).

[2] N. K. Sarkar und S. R. Maitra, Ann. Biochem. Exp. Med. *46*, 87 (1946).

[3] K. Slotta und H. Fraenkel-Conrat, Memorias do Instituto Butantan *11*, 121 (1937).

keit von Najarohgift höchstens um den vierten Teil zurückgeht[1].

Vor einiger Zeit wurde sehr klar gezeigt, dass im *Najarohgift* drei Arten –S–S–Brücken verschiedener Reaktionsfähigkeit existieren. Lässt man Kaliumzyanidlösungen verschiedener Konzentration auf das Gift verschieden lange einwirken, fällt das Protein mit Ammoniumsulfat, zentrifugiert und wäscht es, dann wird es in wechselndem Grade inaktiv, und entsprechend gross ist die nachzuweisende Menge der freien Thiolgruppen[2] (Abb. 12).

Die Stärke der Nitroprussidreaktion – in Abbildung 12 durch +, ++, +++ angegeben – zeigt qualitativ und die Menge verbrauchten Jods quantitativ die Zunahme der entstandenen Thiolgruppen an. Man kann deutlich drei Stufen der Schädigung des Giftes nach vierstündiger Einwirkung des Zyanids unterscheiden. Die erste liegt bei Gift, das mit 0,5prozentiger Kaliumzyanidlösung behandelt wurde. Es verbraucht dann je 25 mg 1 cm³ n/500 Jodlösung und hat einen 50prozentigen Aktivitätsverlust erlitten. Mit einprozentiger Zyanidlösung behandelt, ist das Gift nur noch 10% so wirksam und verbraucht 2 cm³ Jodlösung. Drei- und höherprozentiges Kaliumzyanid macht es nach der gleichen Zeit vollkommen unwirksam, und es werden 3 cm³ Jodlösung verbraucht.

Nun ist, wie schon ausgeführt, die Molekelgewichtsbestimmung eines solchen Polypeptids wie des Najaneurotoxins nicht genau durchführbar, aber nimmt man als einen sehr wahrscheinlichen Wert dafür 3500 an und zieht die vorliegenden Schwefel- und Zystinanalysen in Betracht, so ergibt sich aus allen diesen Versuchen, dass das Molekül dieses Toxins drei –S–S–Brücken enthält. Man kann sich vorstellen, dass durch die Zyanideinwirkung zuerst eine, dann die zweite und schliesslich die dritte dieser Brücken gesprengt und das Molekül entsprechend immer unwirksamer wird.

Die nähere Untersuchung der Thiol- und –S–S–Gruppen in den Schlangengiften und anderen Proteinen im Zusammenhange mit deren physiologischen Wirkungen ist jedenfalls eines der grundlegenden Probleme der Biochemie.

[1] F. Micheel und H. Schmitz, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 703 (1938).

[2] G. Wellers, Rev. canad. Biol. *8*, 139 (1949).

Summary

The different snake venoms are mixtures of a large number of physiologically active proteins. So far only the venoms of the Indian cobra (*Naja naja*) and the Bazilian rattlesnake (*Crotalus t. t.*) have been investigated. The hemolytically active component of the *Naja* venom is a protein of molecular weight 33,000, which in the electrophoretic experiment moves together with the neurotoxically active principle. It was possible to separate the two substances by chemical and physical-chemical methods, to crystallize hemolysin and to purify neurotoxin to a large degree. It proved to be a strongly basic, sulphur containing polypeptid.

Rattlesnake venom contains a similar compound of a globulin character which possesses all of the hemolytic and neurotoxic activity of the crude venom. It was crystallized, named «Crotoxin» and further investigated. It is a homogeneous molecule of molecular weight 30,000, which is probably also constituted by basic polypeptid-residues and a protein. Crotoxin is composed of 18 amino acids and is much more sensitive to chemical influences than other physiologically active proteins.

The coagulating and proteolytic activities particularly characteristic of the viper venoms (Russelviper, *Bothrops* sp., *Crotalus t.t.*) always appear together and are liable to be qualities of another protein.

The great virulence of those protein molecules probably depends on the presence of cystin- or cystein-residues, and on their position within the molecule.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Content of Certain Spherical Polyhedra for any Number of Dimensions

Consider in Euclidean n-space the set of points $(z_1, z_2, \ldots, z_n)$ satisfying

$$\left.\begin{aligned} &\sum_{k=1}^{n} z_k^2 = 1\,, \quad \text{and} \quad \sum_{k=1}^{n} b_{ik}\, z_k \geqq 0 \qquad (i = 1, \ldots, n) \\ &\text{[the } n \text{ polynomials } \sum_{k=1}^{n} b_{ik}\, z_k \; (i = 1, \ldots, n) \text{ being linearly independent].} \end{aligned}\right\} \quad (1)$$

Let the numbers c_{ij} be defined by

$$c_{ij} = \sum_{k=1}^{n} b_{ik}\, b_{jk} \quad (i = 1, \ldots, n;\ j = 1, \ldots, n). \tag{2}$$

If, for $i = 1, \ldots, n$ and $j = 1, \ldots, n$,

$$\left\{ \begin{array}{ll} c_{ij} = 1 & \text{if } i - j = 0 \\ |c_{ij}| < 1 & \text{if } |i - j| = 1 \\ c_{ij} = 0 & \text{if } |i - j| \geqq 2 \end{array} \right\}, \tag{3}$$

then the $(n-1)$-dimensional content of the point set defined by (1) is given by

$$\left. \begin{array}{l} (\pi/2)^m \cdot \prod_{k=1}^{m-1} (n - 2k)^{-1} \cdot \sum_{s=0}^{m} (2/\pi)^s \cdot I_s, \text{ where} \\ m = [\tfrac{1}{2} n],\ I_0 = 1, \text{ and for } 0 < s \leqq m \\ I_s = \sum_{i_1, i_2, \ldots, i_s} \underbrace{\begin{vmatrix} c_{i_1 i_1} & \cdots & c_{i_1 i_s} \\ \vdots & & \vdots \\ c_{i_s i_1} & \cdots & c_{i_s i_s} \end{vmatrix}_{0 \ \cdots \ 0}}_{s} \\ \left(D \begin{matrix} i_1 j_1 i_2 j_2 \cdots i_s j_s \\ i_1 j_1 i_2 j_2 \cdots i_s j_s \end{matrix} \right)^{-\frac{1}{2}} d\gamma_{i_1 i_1} d\gamma_{i_2 i_2} \cdots d\gamma_{i_s i_s} \end{array} \right\} \tag{4}$$

In the sum defining I_s (for $0 < s \leqq m$):

(*a*) $j_p = i_p + 1$ $(p = 1, \ldots, s)$,

(*b*) $i_1, i_2, \ldots, i_s$ is any set of s integers with $i_1 < i_2 < \ldots < i_s$ chosen from the whole numbers 1 up to $(n-1)$ inclusive in such a way that for each pair (i_p, i_q) of integers in the set the inequality $|i_p - i_q| \geqq 2$ holds good,

(*c*) summation is over all sets $i_1, i_2, \ldots, i_q$ satisfying this description,

(*d*) $D \begin{matrix} i_1 j_1 i_2 j_2 \cdots i_s j_s \\ i_1 j_1 i_2 j_2 \cdots i_s j_s \end{matrix}$ stands for the determinant of the $2s \times 2s$ square symmetrical matrix $\|e_{gh}\|$ in which the elements e_{gh} (g and h running, each of them, through $i_1, j_1, i_2, j_2, \ldots, i_s, j_s$) are given by

$\left\{ \begin{array}{l} e_{gh} = \gamma_{gh} \text{ if } g = i_p \text{ and } h = j_p = i_p + 1 \ (p = 1, \ldots, s), \\ \text{and} \\ e_{gh} = c_{gh} \text{ otherwise } [c_{gh} \text{ was defined in (3)}]. \end{array} \right.$

If in (1) $\sum_{k=1}^{n} z_k^2 = 1$ is replaced by $\sum_{k=1}^{n} z_k^2 \leqq 1$, the result (4) is to be multiplied by $1/n$, of course.

The $(n-1)$-dimensional content of the point set defined by (1) occurred in a problem in statistics[1]. It had been investigated, however, as early as 1852 by SCHLÄFLI[2] who gave a number of theorems on it, but nothing like a general result by which this content should be explicitly determined. COXETER[3] gave a rather complicated series development for the content of orthoschemes (see below) in case $n = 4$; there is no hint at our result (4) in his paper; moreover, (4) holds with any (integer) value of n $(\geqq 2)$.

If $c_{ij} = 0$ for each pair (i, j) with $|i - j| \geqq 2$ $(i = 1, \ldots, n;\ j = 1, \ldots, n)$, the point set defined by (1) is called an n-spherical orthoscheme by SCHLÄFLI[1] (l.c., p. 74); if this equality does not hold true for each pair (i, j) with $|i - j| \geqq 2$, the point set defined by (1) is called an n-spherical plagioscheme by SCHLÄFLI (l.c., p. 58); I would prefer the terms $(n-1)$-dimensional spherical orthoscheme, and plagioscheme, respectively. The result (4) obtains for orthoschemes only. Research on plagioschemes is in progress, as is research on the expansion of I_s in a particular, relatively simple, multiple series.

The result (4) can be proved by two widely different methods, one of them being a straightforward solution of the system of linear partial differential equations of the first order given by SCHLÄFLI[1] (l.c., p. 65). Both methods are somewhat lengthy, but fairly elementary.

H. R. VAN DER VAART

Zoological Laboratory of University, Leiden, November 22, 1952.

Zusammenfassung

In kurzer Form wird der Inhalt gewisser (orthoschematischer) sphärischer Polyeder für eine willkürliche Dimensionenzahl mitgeteilt. Diese Formel bildet die Lösung eines von SCHLÄFLI aufgestellten Systems linearer partieller Differentialgleichungen erster Ordnung.

[1] H. R. VAN DER VAART, Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. *53*, 494, 507 (1950); Indagationes Mathematicae *12*, 146, 159 (1950).

[2] J. H. GRAF, Mitt. Bern. Naturfor. Ges. *1896*, 77. – L. SCHLÄFLI (hg. v. J. H. GRAF), *Neue Denkschriften der allgemeinen schweizerischen Gesellschaft für die gesamten Naturwissenschaften*, Bd. *38* (1901), IV und 239 S.

[3] H. S. M. COXETER, Quart. J. Math., Oxf. Ser. *6*, 13 (1935).

[1] L. SCHLÄFLI (hg. v. J. H. GRAF), *Neue Denkschriften der allgemeinen schweizerischen Gesellschaft für die gesamten Naturwissenschaften*, Bd. *38* (1901), IV u. 239 S.

Notes on the Alkaloids of *Picralima*

The alkaloids of *Picralima nitida* occur in the seeds and have been studied by HENRY and SHARP[1] and HENRY[2], as well as by RAYMOND-HAMET[3] who has given a review of the subject[4].

Akuammine[5].—The formula attributed to the base by HENRY and SHARP[1] was $C_{22}H_{28}O_4N_2$, but the results did not exclude $C_{22}H_{26}O_4N_2$. 16 analyses of 12 different specimens (all decomposing at 254–259°) gave as average C, 69·02; H, 6·88%. 10 results within ±0·3% of the mean gave C, 68·98%, and 13 results within ±0·1% of the mean gave H, 6·88%. The average of 6 results gave N, 7·18%. $C_{22}H_{26}O_4N_2$ requires C, 69·09; H, 6·85; N, 7·33%. $C_{22}H_{28}O_4N_2$ requires C, 68·73; H, 7·34; N, 7·29%. The formula with H_{26} is evidently preferable.

The groups known to be present are 1 OMe, 1 NMe, 1 OH which we have confirmed. 1 CMe is also present (found, Me, 2·89%). Akuammine is a strong base, pK_a, 7·5 (strychnine, 7·6) and electrometric titration with alkali gave a curve with no inflection up to pH 10. This

[1] T. A. HENRY and T. M. SHARP, J. Chem. Soc. *1927* (1950).

[2] T. A. HENRY, J. Chem. Soc. *1932*, 2759.

[3] M. RAYMOND-HAMET, C. r. Acad. Sci. *211*, 125 (1940); Arch. exp. Path. Pharm. *199*, 399 (1942); C. r. Soc. Biol. *137*, 404 (1943); *138*, 199 (1944); C. r. Acad. Sci. *221*, 699 (1945); *230*, 1183 (1950); Rev. Int. bot. app. Agric. trop. *31*, 465 (1951); C. r. Acad. Sci. *233*, 560 (1951).

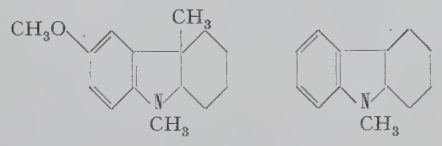
[4] M. RAYMOND-HAMET, Rev. Int. bot. app. Agric. trop. *31*, 465 (1951).

[5] The initiation of the present investigation was the result of the good offices of Professor E. SCHLITTLER who put us in touch with Dr. A. UFFER of Ciba, Ltd. Dr. UFFER separated the alkaloidal content of seeds of *Picralima nitida* collected in Kumasi (August, 1947) and very kindly sent us substantial quantities of akuammine and fractions obtained in the course of his work. We are also deeply indebted to Dr. T. M. SHARP of the Wellcome Research Laboratories for specimens of akuammine and some of its congeners. The akuammine was derived from *Picralima Klaineana* and was found by comparison of I. R. spectra to be identical with that from *Picralima nitida*.

was not in agreement with our preconception that the base was a readily hydrolysable lactone. This idea was linked with the postulation of a methoxyl group in the benzene nucleus which appeared to be supported by the behaviour of model compounds.

Actually akuammine is a phenol as shown by its immediate solubility in methanolic alkali (it is only sparingly soluble in methanol) and recoverability on addition of acid (identical I.R. spectra), by its coupling with *p*-nitrobenzenediazonium salts to an azo-compound which dissolves in alcoholic alkali to a blue solution, and finally by its reaction with 2:6-dichloroquinone-chloroimide in warm acetic acid solution to a reddish violet dye which becomes pure blue on the addition of sodium hydroxide. The latter reaction resembles that exhibited by *p*-methylaminophenol (metol).

Akuammine develops at once a characteristic orange red colouration with ferric chloride in very dilute cold hydrochloric acid solution. After acetylation no colour is developed, even on keeping for some hours. Exactly the same colour is somewhat more slowly developed under these conditions by the model substance (I), but not by any other of the three isomers in which the methoxyl occupies one of the alternative positions in the benzene nucleus.



(I) (II)

This model behaves similarly to akuammine in other reactions and it is likely that the methoxyl group of (I) is easily eliminated in oxidative processes.

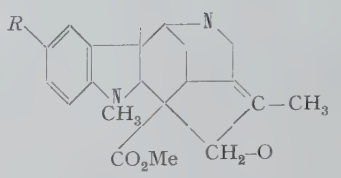
RAYMOND-HAMET[1] found that the U.V. absorption spectrum indicated a hydro-indole structure, and this we have confirmed. The I.R. absorption shows bands at 3·06 μ (OH or NH), 5·76 μ (ester or lactone unconjugated with C=C), and 12·33 μ (probably 1:2:4-trisubstituted benzene) supported by absence of bands at 13·3 μ (1:2-disubstituted benzene) and 12·8 μ (1:2:3-trisubstituted benzene).

The instability of akuammine under certain conditions in hot alcoholic solution is now understandable since it is a derivative of *p*-aminophenol. Before we knew this, a considerable loss of material occurred in a final recrystallisation. The product was distilled with zinc dust (WITKOP's technique) and afforded 3-ethylpyridine and (probably) skatole. The 3-ethylpyridine was identical with a synthetic specimen.

Akuammine is only slowly hydrogenated (palladised charcoal or ADAM's catalyst in ethanol), and appears to afford a dihydro-derivative which requires further study. The hydrochloride had m.p. 232–233° and crystallised with one C_2H_6O. Models of type (II) show oxidation colour reactions quite different from those of type (I) due to dehydrogenation of the hydro-indole nucleus. Akuammine behaves like a 2:3:3-trisubstituted dihydroindole and thus must be classified as a strychnine (β) rather than a yohimbine (α) type[2].

The constitution (III) fits all the known facts including the pharmacological findings of RAYMOND-HAMET that akuammine resembles cocaine in its action.

The position of the double bond is the most doubtful feature. It is provisionally placed to accomodate the fact that akuammine gives the iodoform reaction.



(III) R=OH
(IV) R=H

(III) and (IV)

Pseudo-akuammigine.—This base[1] has the formula $C_{22}H_{26}O_3N_2$, H_2O, it contains 1 OMe and 1 NMe. Unlike akuammine it has no reducing properties towards ammoniacal silver solutions and the I.R. absorption shows no band corresponding to OH or NH below 3·28 μ where the absorption by the paraffin paste commences. There is a band (ester C=O) at 5·76 μ, exactly the same frequency as with akuammine, and a band at 13·26 μ indicating a disubstituted benzene derivative. Otherwise the I.R. spectrum is very similar to that of akuammine.

The formula (IV) is indicated, that is akuammine less the phenolic hydroxyl, but there are two difficulties; in the first place, the oxidative colour with ferric chloride is developed reluctantly; this could be attributed to the proximity of the ester group to the methylimino group. Secondly, the (C)Me determination indicates two such groups. Whilst this result can be accomodated by modification of (IV), it is also possible that some $-CO_2Me$ has become $-CO_2Et$ in the course of working up the bases using ethanolic solutions. Very little material is available, and we hope to return to this point.

The U.V. absorption[2] indicates a dihydro-indole constitution. We have confirmed this, but note that the shape of the curve is somewhat anomalous for an N-methylhexahydrocarbazole, and this may once more be due to the proximity of $-CO_2Me$ to NMe.

Akuammidine ($C_{21}H_{24}O_3N_2$, H_2O).—This base contains 1 OMe (NMe absent) and affords an acetyl and a benzoyl derivative[1]. RAYMOND-HAMET detected two active hydrogen atoms[3] and we find (C)Me, 5·3%, [2(C)Me requires 8·2%].

The U.V. spectrum[4] shows that the base is a true indole derivative and it thus belongs to the α-series. Largely on pharmacological grounds, but also on account of hydrolysis to the amphoteric akuammidinic acid, RAYMOND-HAMET[3] proposed the constitution of a dide-hydroyohimbine. This fits the occurrence of two active H atoms but not the (C)Me determination. It is hard to reconcile these results and the problem requires further study.

Akuammigine ($C_{22}H_{26}O_3N_2$,H_2O) is also an indole derivative (U.V. spectrum)[5] containing 1 OMe but no NMe[1].

[1] M. RAYMOND-HAMET, C. r. Acad. Sci. *230*, 1183 (1950).

[2] The expressions "strychnine" and "yohimbine" types are not very satisfactory. Taking cognisance of the well established biogenesis we could speak of the α-series and β-series (yohimbine and strychnine respectively) which indicate the coupling of the α- or β-positions of tryptamine with the second amino-acid component (e.g. dihydroxyphenylalanine).

[1] T. A. HENRY, J. Chem. Soc. *1932*, 2759.

[2] M. RAYMOND-HAMET, C. r. Acad. Sci. *230*, 1183 (1950).

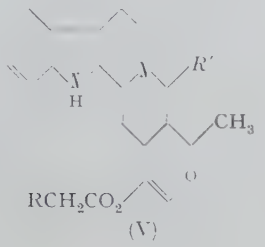
[3] M. RAYMOND-HAMET, Rev. Int. bot. app. Agric. trop. *31*, 465 (1951); cf. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux *90*, 178 (1952).

[4] M. RAYMOND-HAMET, C. r. Acad. Sci. *221*, 699 (1945).

[5] M. RAYMOND-HAMET, C. r. Acad. Sci. *221*, 699 (1945); *332*, 560 (1951).

We find (C)Me 5·78, 6·37%; active H, 0·62% [2(C)Me requires 7·7 and 2 H requires 0·52%].

The I.R. absorption spectrum includes bands at 2·82, 3·00 and 3·28 μ (OH and NH), 5·86 μ and 5·94 μ (ester or ketone carbonyl group conjugated with a double bond), 6·14 μ (asymmetrically substituted double bond) and 13·50 μ (o-disubstituted benzene nucleus). This evidence, together with the U.V. is consistent with the presence of $MeO_2C—C=C—O—$, although the extra conjugated carbonyl peak in the I.R. is an unusual feature. There is an "extra" carbon atom, probably corresponding to a (C)Me, and the constitution (V) is feasible (R = H, R' = Me, or R = Me, R' = H), this structure also showing the suggested[1] relation to mayumbine.



(V)

Akuammiline ($C_{22}H_{24}O_4N_2$) contains 1 OMe and no NMe[2]. It appears to contain two (C)Me groups (7·0%, theory, 7·9%), and its U.V. spectrum is in the main like that of an indole, although it presents some slight variations. The first maximum at 2,200 A (logε, 4·25) is about 50 A shorter, and the second peak (λ_{max}, 2,400 A; logε, 3·54) is rather broader than usual. The I.R. absorption shows a broad and very weak band at 2·9 μ (OH or NH or not significant), bands at 5·76 μ (C = O of unconjugated ester type), at 6·16 μ (probably C = C but could be C = N), at 6·26 μ (more conjugated C = C), at 13·29 μ (o-disubstituted benzene, but this is uncertain because bands at 12·90 and 13·21 μ are also observed).

Akuammiline could be a keto-akuammigine or a hydroxydehydroakuammigine. The modified indole spectrum suggests that a functional group is attached to the indole nucleus. The base gives a bright crimson red Otto reaction which is characteristic.

Akuammicine ($C_{19}H_{22}O_2N_2$) is said to contain 1 OMe and no NMe (but *v.infra*). In many ways it is *sui generis* with the remarkably high rotatory power $[\alpha]_D$ – 737·5° (in alcohol)[2]. Its Otto reaction is an intense and persistent royal blue colour.

The U.V. spectrum differs fundamentally from the spectra of the congeneric alkaloids. It is almost identical with that given by echitamidine[3] (which also has a high rotatory power[4]) and suggests considerable conjugation.

Among strychnine derivatives, benzylidenestrychnine exhibits a deep blue Otto reaction, and high rotatory powers are observed with a number of substances in the group which have double bonds in conjugation with the amide carbonyl. We may be sure that akuammicine contains the part structure —N—CO—C=C, with an asymmetric centre vicinal to an unsaturated group.

(C)Me determination gave Me 6·15, 6·6% [2(C)Me requires 9·68%].

The I.R. absorption spectrum has bands at 2·99 μ (OH or more probably NH), 6·03 μ (typical amide carbonyl, probably with further conjugation), 6·24 μ (probably armoatic double bond), 13·39 μ (o-disubstituted benzene, supported by absence of bands at 12·3 and 12·8 μ).

In the case of echitamidine[1] about half of the methyl was obtained as OMe (Zeisel) and half as NMe (Herzig-Meyer), but there is only one methyl group, and hence the (O)Me is unusually hard to remove, or the (N)Me is unusually labile. We prefer the latter hypothesis, which was noted by Goodson as a possibility, because COOMe cannot be present in akuammicine and it is hard to accomodate a methoxyl group otherwise.

M. F. Millson, R. Robinson and A. F. Thomas

The Dyson Perrins Laboratory University of Oxford, December 17, 1952.

Zusammenfassung

Für das Alkaloid *Akuammin* wird die neue Bruttoformel $C_{22}H_{26}O_4N_2$ aufgestellt und durch Vergleich verschiedener UV.- und IR.-Spektren und Reaktionen das Vorliegen einer 5-Hydroxydihydroindol-Verbindung abgeleitet. Die Zinkstaubdestillation liefert 3-Äthyl-Pyridin und vermutlich Skatol. Als Arbeitshypothese wird für *Akuammin* die Formel (III) vorgeschlagen. Die UV.- und IR.-Spektren und Reaktionen von Pseudoakuammigin, Akuammigin, Akuammilin und Akuammicin sind gleichfalls diskutiert.

[1] J. A. Goodson, J. Chem. Soc. *1932*, 2626.

The Origin of Steric Hindrance in Cyclohexane Derivatives

Hassel[1] and Pitzer[2] and coworkers have pointed out that in the stable or "chair" form of cyclohexane there are two types of bonds, so-called equatorial (a or e) and polar (ε or p) bonds. On the basis of this concept, Barton[3] has been able to make important and far-reaching predictions on the reactivity of substituted cyclohexanes and natural products containing cyclohexane rings. One of these predictions is concerned with the relative ease of esterification of hydroxyl groups and ease of hydrolysis of ester groups in polar and equatorial positions. Hydroxyl groups are esterified more easily and ester groups hydrolyzed more easily when in the *equatorial* than when in the *polar* position, due to the greater steric hindrance in the latter. The reason for this might be twofold. It is possible that an ester group in the polar position of a substituted cyclohexane has to stay in this position during hydrolysis and that the resulting crowded transition state (crowded due to steric interference of non-adjacent polar substituents) accounts for the relatively slow rate (reaction path A). On the other hand, it is also possible that prior to reaction the molecule is forced into a different conformation in which the ester group is now in the equatorial position (and some other, more bulky group in the polar position), and that the slower rate is due to the extra energy required to bring about the conformational transformation (reaction path B).

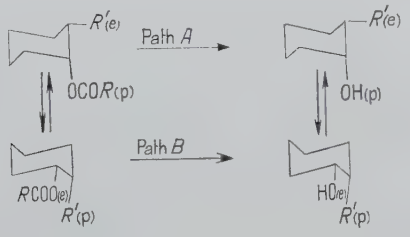
[1] M. Raymond-Hamet, C. r. Acad. Sci. *233*, 560 (1951).
[2] T. A. Henry, J. Chem. Soc. *1932*, 2759.
[3] M. Raymond-Hamet, C. r. Acad. Sci. *233*, 560 (1951).
[4] J. A. Goodson, J. Chem. Soc. *1932*, 2626.

[1] O. Hassel *et al.*, Acta Chem. Scand. *1*, 149, 929 (1947), and earlier papers.
[2] C. W. Beckett, K. S. Pitzer, and R. Spitzer, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2488 (1947).
[3] D. H. R. Barton, Exper. *6*, 316 (1950).

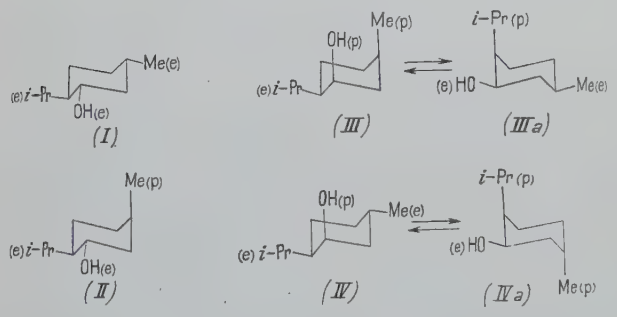
Stable Conformation				Conformation with OH-Group equatorial				
Group	Me	OH	*i*-Pr	*R**	Me	OH	*i*-Pr	*R**
Menthol (I)	e	e	e	1	e	e	e	1
Isomenthol (II)	p	e	e	2	p	q	e	2
Neoisomenthol (III) . . .	p	p	e	4	e	e	p	3 (IIIa)
Neomenthol (IV)	e	p	e	3	p	e	p	4 (IVa)

* *R* Expected order of reactivity.

Fortunately data are already in the literature to permit one to distinguish between these two possibilities.



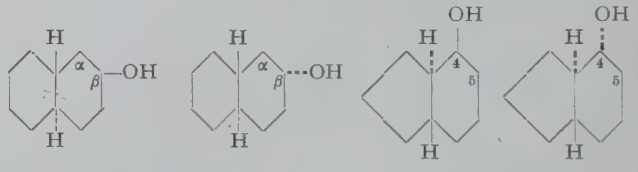
Read and Grubb[1] have measured the relative rates of esterification of the menthols with *p*-nitrobenzoyl chloride by competitive reaction in pyridine at 25°C and found them to be 16·5 for menthol (I), 12·3 for *iso*menthol (II), 3·1 for neo*iso*menthol (III) and 1·0 for neomenthol (IV).



Presumably, the stable conformations of these molecules are such that the most bulky group (*iso*propyl) occupies an equatorial position[2], as shown in the Table at the top.

Barton[3] has already pointed out that compounds having the hydroxyl group in the equatorial position in their most stable conformations are esterified faster than those having it in the polar position. Thus (I) and (II) are esterified faster than (III) and (IV). (II), which has a nonreactive substituent in the polar position reacts more slowly than (I) which has only equatorial substituents. However, if neo*iso*menthol and neomenthol reacted in their stable conformations—(III) and (IV)—one would expect (IV) to be esterified more rapidly than (III). In (III) there is severe crowding of the polar hydroxyl group by the nonadjacent polar methyl group while in (IV) the crowding is much less severe. Yet neomenthol (IV) is esterified only at one-third the rate of neo*iso*menthol (III). This is reasonable only if the molecules are converted to the less stable conformations—(IIIa) and (IVa)—prior to esterification. In these conformations—(IIIa) and (IVa)—the hydroxyl group is in the less crowded equatorial position and therefore more easily accessible to the esterifying reagent. The change from (IV) to (IVa) will be less facile than that from (III) to (IIIa), since in the former *two* alkyl groups (methyl and isopropyl) have to be forced into the crowded polar positions, in the latter only *one* (*iso*propyl). Therefore, making the reasonable assumption that (IIIa) and (IVa) are of the same order of reactivity, (III) should be esterified more readily than (IV), which is in accordance with the experimental facts.

A similar way of looking at the facts is to say that at room temperature (III) is in equilibrium with a small amount of (IIIa) [and (IV) with (IVa)]. Since (IIIa) is esterified more readily than (III), more (III) is continuously converted to (IIIa) until all has reacted in that form. Energetically, the two pictures are equivalent.



(or α-isomers) (V) (or 5 isomers) (VI)

On the basis of this interpretation one would predict that cyclohexanols bearing a polar hydroxyl group *in a rigid system* which cannot change conformation so as to place the hydroxyl group in the equatorial position should show much greater difference in esterification and saponification rates (compared with their epimers with equatorial hydroxyl groups) than the more mobile molecules discussed above. Such rigid molecules are the *trans*-decalols (V) and *trans*-hydrindanols (VI) as well as the steroid alcohols. Quantitative data from the steroid field are not available, but qualitative observations[1] point to a large difference in ease of esterification and hydrolysis between epimers. The decalols,

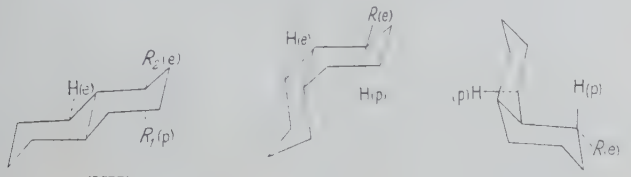
Compound	k 60°	k II/kI
trans-α-decalol, Isomer I (VIIa)	0·0382	
trans-α-decalol, Isomer II (VIIb)	0·725	19·0
trans-β-decalol, Isomer I.	0·470	
trans-β-decalol, Isomer II	3·25	6·91
cis-*o*-methylcyclohexanol	0·0199	
trans-*o*-methylcyclohexanol	0·0352	1·77
cis-α-decalol, Isomer I (VIIIa)	0·438	
cis-α-decalol, Isomer II (VIIIb)	1·201	2·75

[1] J. Read and W. J. Grubb, J. Chem. Soc. *1934*, 1779.
[2] W. Hückel *et al.*, Ann. Chem. *533*. 128 (1937).
[3] D. H. R. Barton, Exper. *6*, 316 (1950).

[1] L. F. Fieser, Exper. *6*, 312 (1950).

on the other hand, have been studied by HÜCKEL and co-workers[1]. Their results on the rate constants for hydrolysis of the decalyl phthalates in water at 60°C bear out the prediction that the difference between epimers in the *trans*-series are larger than in cyclohexane (see Table at the bottom of page 92).

The difference in hydrolysis rate between the epimeric *trans*-α-decalyl phthalates (VII a, b) would probably be even greater, were it not for steric interference of the *peri*-hydrogen atom with the ester-group where the latter is in the equatorial position. It is probably this interference of the *peri*-hydrogen atom which accounts for the sizable difference in saponification rates of the epimeric *cis*-α-decalyl phthalates (VIII a, b) despite the fact that both epimers in this series have the ester-group in the equatorial position.



(VII) (VIII a) (VIII b)

(a) R_1=o-C_6H_4(COOH, COO—), R_2=H

(b) R_1=H, R_2=o-C_6H_4(COOH, COO—)

R = o—C_6H_4(COOH, COO—)

Acknowledgement

The author is grateful to Professors H. C. BROWN and SAN-ICHIRO MIZUSHIMA for stimulating discussions regarding the stereochemistry of the menthols and decalols.

E. L. ELIEL

Department of Chemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, U.S.A. On leave of absence at the Ohio State University, September 1, 1952.

Zusammenfassung

Aus der Veresterungsgeschwindigkeit der stereoisomeren Menthole mit *p*-Nitrobenzoylchlorid lässt sich schliessen, dass diese Moleküle in derjenigen Konstellation reagieren, in welcher die Oxygruppe eine äquatoriale Stellung einnimmt. In starren Molekülen (wie die *trans*-Dekalole), bei denen die Verschiebung einer Oxy- oder Estergruppe von der polaren in die äquatoriale Stellung nicht möglich ist, findet man besonders grosse Unterschiede in der Verseifungsgeschwindigkeit von epimeren Estern. Der Unterschied in der Verseifungsgeschwindigkeit von Estern der epimeren *cis*-α-Dekalole, die beide die Oxygruppe in der äquatorialen Stellung haben, lässt sich durch verschiedene sterische Hinderung durch eins der Wasserstoffatome in der *peri*-Stellung erklären.

[1] W. HÜCKEL *et al.*, Ann. Chem. *533*, 128 (1937).

Weitere Untersuchungen über Bakterienchemotaxine

In Arbeiten über chemotaktische Stoffe aus pathogenen Bakterien[1] konnte gezeigt werden, dass eine ganze Reihe von Bakterien, auf tierischem Plasmanährboden gehalten, Stoffe produzieren, die durch sterile Filtration abtrennbar *in vitro* starke chemotaktische Wirkung auf Leukozyten ausüben. Bei der Untersuchung gonadotroper Fraktionen aus sterilem Schwangernharn[1] ist es uns gelungen, ebenfalls Stoffe nachzuweisen, die eine stark anlockende Wirkung auf Leukozyten *in vitro* ausüben. Beide Stoffe haben zudem gemeinsam die Eigenschaft, dass sie thermostabil und nicht ultrafiltrierbar sind.

Zur weiteren Analyse der Natur solcher Chemotaxine untersuchten wir eine Reihe bedingt apathogener Keime. Die in Bouillon mit Ei während 72 h gezüchteten Bakterien wurden 3mal mit Tyrode gewaschen und in früher beschriebener Weise auf den Plasmanährboden neben die Leukozytenkulturen geimpft. Nach 24 h Bebrüten ergibt sich bei geeignetem Bakterienabstand ein Hinwandern der Leukozyten zur Bakterienkultur (Tab. I, Kol. 1, Chemotaktische Wirkung lebender Bakterien).

Die gewaschenen Bakterien wurden durch Hitze abgetötet, zentrifugiert und das Sediment mit einer Öse neben die Leukozytenkultur gebracht (Tab. I, Kol. 2, Chemotaktische Wirkung gewaschener, abgetöteter Bakterien). Werden gewisse chemotaktische Substanzen in Lösung gebracht, den Leukozytenkulturen überschichtet, so findet an Stelle der gerichteten Auswanderungsförderung eine allgemeine Vergrösserung des Auswanderungsareals statt, was damit gezeigt werden konnte, dass die gewaschenen, abgetöteten Bakterien in Tyrode aufgenommen wurden; eine Auswanderungsförderung konnte überall dort nachgewiesen werden, wo auch mit abgetöteten Bakterien eine Chemotaxis nachweisbar war (Tab. I, Kol. 3, Auswanderungswirkung gewaschener, hitzesterilisierter Bakterien). Weiterhin wurde der Bouillonnährboden auf Anwesenheit von auswanderungsfördernden Substanzen untersucht. Mit 24 h alten Bakterienkulturen wurden Nährböden beimpft, 72 h bebrütet und zentrifugiert. Die überstehende Bouillon wurde abpipettiert und im Dampftopf sterilisiert (Tab. I, Kol. 4, Auswanderungswirkung von Kulturlösungen).

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die meisten der untersuchten Bakterien auf tierischen Nährboden proliferierend eine chemotaktische Wirkung ausüben. Unter den auf Bouillon kultivierten gewaschenen und abgetöteten Keimen sind es jedoch mit Ausnahme von Diphtherie die gramnegativen, die thermostabile Chemotaxine enthalten. Diese thermostabilen Chemotaxine aus gramnegativen Keimen fördern in wässriger Lösung die Auswanderung, und es konnten in nennenswertem Ausmass nur in bakterienfreien Kulturlösungen gramnegativer Keime Stoffe gefunden werden, die Wirksamkeit besitzen.

In unsern chemischen Laboratorien wurden von BENZ aus den 72 h mit *Proteus vulg.* 0X19 bebrüteten und steril filtrierten Bouillons verschiedene Fällungen gemacht. Diese wurden entsprechend den zu ihrer Herstellung benötigten Bouillonmengen verdünnt und an der Leukozytenkultur mit der Wirkung des ursprünglichen Filtrates verglichen. Tabelle II zeigt die Wirkung der verschiedenen Fällungen auf das Auswanderungsareal der Leukozyten.

Alle diese Fällungen sind hitzebeständig und nicht dialysierbar. Bei Rohfällungen können durch wegdialysieren niedermolekularer Stoffe besser wirksame Präparate erzielt werden.

Aus diesen Versuchen lässt sich ableiten, dass sowohl grampositive wie auch gramnegative Keime auf tierischem Nährboden lebend in kurzer Zeit Chemotaxine produzieren. In Bouillon gezüchtet, enthalten und bilden

[1] R. MEIER, Helv. chim. Acta *24*, 134 E (1941).

[1] R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. *7*, 308 (1951).

Tabelle I

Bakterienstämme	Chemotaktische Wirkung lebender Bakterien auf Plasmanährboden	Chemotaktische Wirkung gewaschener, erhitzter Bakterien (Bouillonkultur)	Auswanderungswirkung durch Suspension gewaschener, erhitzter Bakterien	Auswanderungswirkung von Kulturlösung 1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000
Bouillon, unbeimpft				∅			
Staphylococcus aureus Nr. 3	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Staphylococcus albus Nr. 4	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Diplococcus sp. Nr. 102	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Streptococcus faecal Nr. 57	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Streptococcus pyog. Nr. 36	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Coryneb. dipht. Nr. 161	+	+	+	∅	∅	∅	∅
Sarc. lutea Nr. 124	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Sarc. alb. Nr. 121	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Proteus vulg. 0 X 19	+	+	+	+ + +	+ + (+)	+ +	∅
Escherichia coli Nr. 201	+	+	+	+ +	+	+	∅
S. marcescens Nr. 261	+	+	+	+ + +	+ + +	+ +	+
Klebsiella, Typ A Nr. 327	+	+	+	+ + +	+ + +	(+)	∅
Cholerae el Tor Nr. 361	+	+	+	+ +	+	∅	∅

\+ = Chemotaxis oder Förderung der Auswanderung ∅ = keine Wirkung

Tabelle II

	Aus 1 cm³ Kulturfiltrat wurden gefällt in mg Substanz	Konzentrationen, bezogen auf das Ausgangsfiltrat pur	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000
Proteus vulg. 0 X 19 (2)				+ + +	+ + +	+ + (+)	+ + (+)	
Proteus vulg. (2), erhitzt				+ + +	+ + +	+ + (+)	+ +	
Proteus vulg. 0 X 19 (4)		+	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +		
Benzoesäurefällung aus (2)	1,05	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+
Lyophilgetrocknetes Filtrat (2)	23,0	– – –	+ +	+ + +	+ + +			
Pikrinsäurefällung aus (4)	1,6	+ + +	+	(+)	∅	∅	∅	
Ammonsulfatfällung aus (4)	6,0	+ +	+ +	∅	∅	∅	∅	
Alkoholfällung aus (4)	5,5	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	(+)
Nährboden, steril filtriert, unbeimpft		–	∅	∅	∅	∅		
Benzoesäurefällung des unbeimpften Nährbodens		(+)	(+)	∅	∅			
Lyophylgetrockneter Bouillonboden		–	∅	∅	∅	∅		

— = Hemmung der Auswanderung + = Forderung der Auswanderung ∅ = Keine Wirkung

jedoch vor allem gramnegative Keime thermostabile Stoffe in nachweisbaren Mengen. Diese thermostabilen Chemotaxine sind sowohl in gewaschenen Bakterien als auch in den Kulturfiltraten vorhanden. Aus den Anreicherungsmethoden sowie aus dem Verhalten bei Hitzebehandlung und Dialysieren kann gefolgert werden, dass die Wirksamkeit an Stoffe von polysaccharidartiger Natur gebunden sein muss[1].

Über den Einfluss des Nährbodens auf die Produktion dieser Chemotaxine sowie über die Natur dieser Stoffe aus grampositiven und gramnegativen Keimen sind weitere Arbeiten im Gange.

R. Meier und B. Schär

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, den 10. Januar 1953.

[1] Vgl. dazu J. L. Bennnett und P. B. Beeson, Medicine *29*, 365 (1950).

Summary

The majority of the bacteria investigated, in the living state exhibited leukotaxis *in vitro*; it is, however, mainly the gramnegative organisms and their culture-filtrates which contain active substances, probably of a polysaccharide-like nature, in readily demonstrable quantities.

The Influence of Light upon Germination

The effect of light on the germination of seeds has been known for a long time[1]. Certain varieties of freshly harvested lettuce seeds, for instance, germinate fully only when exposed to light. Although the biological process of germination is evidently a complicated one, addi-

[1] Cf. M. Evenari in *Radiation Biology* (McGrawHill & Co., New York) (in the press).

tional evidence has recently become available which enables one to interpret the mechanism of certain steps in light-germination in some well defined cases.

Recently HENDRICKS and coworkers[1] have shown that light between the wavelengths of 5250 and 7000 Å promotes germination whilst radiation in the region of 7000 to 8200 Å reverses this effect. The maximum of promotion occurs at about 6600 Å, the maximum of inhibition at about 7300 Å.

The temperature at which germination is carried out has a profound influence on light germination. Thus lettuce seeds, var. Grand Rapids, germinate at 14°C with the same high percentage in light and darkness. With rising temperature, germination becomes more and more inhibited in darkness. This inhibition is overcome by light. The maximum of this light sensitivity is reached at 26°C. At higher temperatures germination decreases in light and in darkness, so that the germination-promoting influence of light is more reduced. At last at 31°C the seeds are heat-dormant[2].

Furthermore, it is known that the promoting effect of light can be replaced under certain conditions by the admission of oxygen[3] or relatively much higher pressure of carbon dioxide[4] into the seeds. There are also certain chemicals known (thiourea[5], coumarin[6]) which can promote or repress germination in conjunction with the effect of light.

These observations are in agreement with the assumption that the fundamental process involved in the induction of germination consists of an electron transfer from a dye, A, which has an absorption peak in the neighbourhood of 6600 Å. The absorption of the appropriate quantum causes the formation of an excited molecule

$$A + h\nu_1 \rightarrow A^* \qquad (1)$$

which, instead of returning to its original state, may lose its excited electron to a neighbouring trap,

$$A^* \rightarrow A^+ + e_{tr} \qquad (2)$$

with the formation of an odd ion. This trap may consist of a potential well, which is formed from a metastable state of the original system in conjunction with the surrounding dielectric medium.

The absorption peak of the new system involving the trapped electron will be shifted to approx. 7300 Å. Absorption of a quantum of suitable energy may cause the release of the electron from its trap and recombination

$$A^+ + e_{tr} + h\nu_2 \rightarrow A. \qquad (3)$$

Similarly an increase in temperature may supply the required energy of activation for liberating the electron from the potential well. The energy requirements of the two types of back reaction need not be identical[7].

Oxygen would react with the original dye molecule with total or partial electron transfer[8]

$$A + O_2 \rightarrow A^+ \cdots {}^-O_2. \qquad (4)$$

In these schemes the important role for the germination process would be played by the odd ion A^+, which could initiate the germination process either in that form, or, after a process of hydration, through its associated free radical, B, where

$$B + H^+ \rightleftarrows A^+. \qquad (5)$$

Similar interpretations have been applied recently to experiments regarding the influence of infrared irradiation and heat on the frequency of mutation induced in certain cases by ultraviolet or ionizing radiations[1]. The effects observed in those cases appeared also compatible with the assumption of the transient formation of trapped electrons in biological systems, and their release from the traps by light or heat.

It was shown recently that oxygen molecules or much higher concentrations of carbon dioxide may serve as electron acceptors[2] in systems consisting of dilute solutions of organic dyes in gels or in organic plasctics[3]. In this case, as also in ionic crystals, as the results of the action of ionizing radiations, some of the ejected electrons may become trapped in the system and a new absorption band appears at a wavelength longer than that of the original dye.

The electrons may be released again and recombination promoted either by re-irradiation with light of the appropriate longer wavelength or thermally. In ionic crystals the activation energy of the thermal back reaction has been found to be of the order of 0·16–0·3 eV, or say 3·5–6·5 kcal[4]. Closely related also is the formation of similar trapped electrons in some semi-conducting systems[5]. Both the wavelenghth promoting the back reaction and the thermal activation energies required are similar in the physical and biological systems. It seems that at least in certain well defined aspects the influence of light upon germination shows regularities which can be best interpreted on the assumption that, in the process of germination, an electron transfer is involved at one stage which involves the reversible trapping of electrons in the biological system.

M. EVENARI and G. STEIN

Department of Plant Physiology and Department of Physical Chemistry, Hebrew University, Jerusalem, October 7, 1952.

Zusammenfassung

Es wird der Versuch gemacht, den Einfluss des Lichtes auf die Samenkeimung (zum Beispiel Salatsamen, var. Grand Rapids) auf einen physikochemischen Mechanismus zurückzuführen. Dieser besteht darin, dass Elektronen in metastabilen Zuständen in Elektronenfallen festgehalten werden. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, dass der Einfluss von Licht verschiedener Wellenlängen, verschiedener Temperaturen und verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Samenkeimung und auf bestimmte physiko-chemische Prozesse, die auf dem oben erwähnten Elektronenmechanismus beruhen, ähnlich ist.

[1] H. A. BORTHWICK, S. B. HENDRICKS, M. W. PARKER, E. H. TOOLE, and V. TOOLE, Proc. Nat. Acad. Sci. *1952* (in the press).

[2] M. EVENARI, Pal. J. Bot. *1952* (in the press).

[3] H. A. BORTHWICK and W. W. ROBBINS, Hilgardia *3*, 275 (1928).

[4] N. C. THORNTON, Contr. Boyce Thomps. Inst. Pl. Res. *8*, 25 (1936).

[5] R. C. THOMPSON and W. F. KOSAR, Science *87*, 218 (1938); Plant. Phys. *14*, 567 (1939).

[6] M. EVENARI, Pal. J. Bot. *1952* (in the press). – G. E. NUTILE, Plant Phys. *20*, 433 (1943).

[7] F. URBACH in *Solid Luminescent Materials* (Wiley, New York, 1948), p. 115.

[8] J. WEISS, Trans. Faraday Soc. *42*, 133 (1946).

[1] G. STEIN, Faraday Soc. Discuss. Radiation Chemistry *12*, 227 (1952). – H. T. YOST, Genetics *36*, 176 (1951). – C. P. SWANSON and H. T. YOST, Proc. Nat. Acad. Sci. *37*, 796 (1951).

[2] G. STEIN, Faraday Soc. Discuss. Radiation Chemistry *12*, 227 (1952).

[3] M. J. DAY and G. STEIN, Nature *166*, 146 (1950); Nucleonics *8*, 11, 34 (1951); Nature *168*, 644 (1951). – E. E. SCHNEIDER, M. J. DAY, and G. STEIN, *ibid.*, p. 645.

[4] E. E. SCHNEIDER, in *Fundamental Mechanisms of Photographic Sensitivity* (Butterworth, London, 1951), p. 13.

[5] G. F. J. GARLICK, *Luminescent Materials* (Oxford University Press, 1949).

Die Abhängigkeit der Bulbillenbildung bei *Poa alpina vivipara* von Photoperiodismus und Frost

Innerhalb des Formenkreises von *Poa alpina* gibt es neben samentragenden Pflanzen vivipare Formen, die sich durch Bulbillen vermehren. Wie schon durch ältere morphologische Untersuchungen nachgewiesen worden ist, entstehen diese Bulbillen durch Verlaubungen von Blütenprimordien[1]. Es war daher naheliegend, die Erbverhältnisse der Vermehrungsweise zu untersuchen und zu prüfen, inwieweit der Reproduktionsmodus von *Poa alpina* durch Aussenfaktoren beeinflusst werden kann. Frühere Autoren stimmen darin überein, dass samentragende Formen rein weiterzüchten und durch Veränderung von Aussenbedingungen nicht zu viviparer Vermehrung gezwungen werden können. Dagegen weichen die Beobachtungen über die Konstanz der Viviparie voneinander ab; bestimmte vivipare Rassen behielten in der Kultur die vegetative Propagation bei[2], während in anderen Fällen Pflanzen, die aus Bulbillen gezogen worden waren, Samensprossen entwickelten[3]. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass solche Stöcke von *Poa alpina* imstande sind, im Verlaufe ihrer individuellen Entwicklung von der Blütenbildung zur Viviparie überzugehen[4]. Versuche, durch Veränderung von Bodenfaktoren eine Umstellung in der Reproduktionsweise zu erreichen, schlugen fehl[5].

Den eigenen Untersuchungen lag die Annahme zugrunde, dass Frosteinwirkung die Reproduktionsbereitschaft von *Poa alpina* auslöst und die darauffolgende photoperiodische Beeinflussung die Vermehrungsweise bestimmt.

Die Hypothese wurde durch Kulturversuche geprüft. Die Versuchspflanzen stammten aus Scoresbysund an der grönländischen Ostküste. Im Herbst 1949 wurden 18 rein vivipare Pflanzen in die Schweiz versetzt und bis zum nächsten Sommer kultiviert. Aus Bulbillen dieser Stammpflanzen wurde eine F_1-Generation von rund 100 Versuchsstöcken nachgezogen und, soweit die Pflanzen nicht vorher eingingen, vom Herbst 1949 bis zum Frühsommer 1952 unter Kontrolle gehalten. Samen von Pflanzen der F_1-Generation, die zur Blütenbildung zurückschlugen, kamen im Sommer 1950 zur Aussaat. Zur Kontrolle wurden einige Versuche mit alpinen Poen schweizerischer Herkunft durchgeführt.

Die Versuchspflanzen waren dem natürlichen, jahreszeitlichen Lichtwechsel ausgesetzt. Um den Einfluss des Frostes festzustellen, wurde im Winters 1949/50 ein Teil der Versuchsstöcke im Freiland gehalten, der Rest im Gewächshaus kultiviert.

Die Versuche haben folgendes ergeben:

1. Die grönländischen Stammpflanzen, soweit sie nochmals zur Reproduktion gelangten, entwickelten unter Langtagbedingungen Bulbillen; unter Kurztageinfluss wurden normale, voll fertile Blühsprosse angelegt.

2. In der aus Bulbillen gezogenen F_1-Generation wurde nach Frosteinwirkung durch *Kurztag* die Bildung von *Blüten*, durch *Langtag* die Entwicklung von *Bulbillen* induziert. Diese Abhängigkeit der Vermehrungsweise von der photoperiodischen Beeinflussung ist dadurch nachgewiesen worden, dass die Versuchspflanzen im Verlaufe ihrer individuellen Entwicklung den Reproduktionsmodus einmal oder mehrfach umstellten. Im Frühling erfolgte der Übergang von Blühsprossen über Intermediärschosse zur Viviparie; im Herbst schlugen bulbillentragende Stöcke zur Blütenbildung zurück. Die minimale Tageslänge zur Auslösung der Bulbillenbildung beträgt rund 14 Stunden. Die photosensible Phase fällt in ein frühes Entwicklungsstadium des Vegetationspunktes; es kann angenommen werden, dass die Determination zur einen oder anderen Vermehrungsweise rund fünf Wochen vor dem Zeitpunkt erfolgt, in welchem sich der Reproduktionsmodus feststellen lässt.

3. Frosteinfluss fördert die Reproduktionsbereitschaft von *Poa alpina*. Ohne Frosteinwirkung blieb der grösste Teil der Versuchspflanzen steril; die wenigen Durchbrenner entwickelten ausschliesslich Blüten, ohne dass sich eine Korrelation zwischen Blütenbildung und photoperiodischer Beeinflussung erkennen liess.

4. Die Samen von Pflanzen, welche zur Blütenbildung zurückgeschlagen hatten, waren voll keimfähig. 12 Tochterpflanzen, welche aus Samen einer isoliert gehaltenen Pflanze der F_1-Generation gezogen wurden, waren weitgehend uniform. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass bei Rückschlägen von der Viviparie zur Samenbildung die Samenentwicklung apomiktisch erfolgt.

5. Die wenigen Versuche mit einer schweizerischen Rasse von *Poa alpina* haben zu keinen widersprechenden Resultaten geführt.

Eine ausführliche Darstellung mit Belegmaterial und Bildern erscheint in *Meddelelser om Grønland* (Verlag Reitzel, København).

F. H. Schwarzenbach

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich, den 21. Oktober 1952.

Summary

Culturing experiments with Greenland plants of *Poa alpina vivipara* have shown that after the action of frost the mode of reproduction is determined by the photoperiodoc factor. The influence of short days produces blossoms and that of long days results in bulbillae.

[1] C. Schröter, *Das Pflanzenleben der Alpen* (Verlag A. Raustein, Zürich 1908), S. 272. – A. Exo, *Poa alpina und die Erscheinung der Viviparie bei ihr*, Diss. Bonn (1916).

[2] C. Schröter und F. G. Stebler, *Die alpinen Futterpflanzen* (Verlag J. Wyss, Bern 1889), 116 S.). – J. Schuster, Flora *100*, 213 (1910).

[3] E. Hunger, *Über einige vivipare Pflanzen und die Erscheinung der Apogamie bei denselben*, Diss. Rostock (1887).

[4] A. Exo, Diss. Bonn. (1916).

[5] Cl. Zollikofer, Jb. St.-Gall. naturwiss. Ges. *65*, 99 (1930).

Growth and Pentose Nucleic Acid Content of Bean Embryo[1]

In his systematic investigation on growth and metabolic activities of a legume, *Vigna sesquipedalis*, during the germination stage[2], one of the authors (Y.O.)[3] has shown how two modes of growth: "division-growth" (growth brought about essentially by protoplasmic protein formation) and "elongation-growth" (growth brought about predominantly by formation of cell wall material, especially cellulose) are in temporal and/or spatial combination in the course of embryonic growth

[1] Aided partially by the Governmental Research Fund for Science.

[2] We mean by the word "germination stage" the heterotrophic period in which the cotyledonous reserve is solely responsible for the nutrient demand of seedling (embryo excluding cotyledon). Under our experimental conditions the stage is thought to continue until the 6th day after sowing the seed when the total dry weight of the seedling reaches its maximum value (Cf. Fig. 1).

[3] Y. Oota, Science (Kagaku), Tokyo *23*, 60 (1953); Embryologia, Nagoya (in press).

of the legume plant, corresponding to temporal and/or spatial differentiations in gas metabolic activities.

It is generally accepted that pentose nucleic acid (P.N.A.) plays an important role in the biosynthesis of protein in the animal tissues[1] as well as in the micro-organisms[2], while in the higher plants little is known on the subject. It was therefore the authors' interest in the present study to see whether the same is true in the higher plant, and whether correlation between the "division-growth" and P.N.A. content could be detected in the legume embryo.

The seeds of *Vigna sesquipedalis* soaked in tap water for 5 h at 30°C, were sown in sand. The cultivation was carried out at 30°C in the dark without any added nutrient. Four embryonic organs (see below) were analyzed for dry weight, protein-N, and P.N.A.-P at 1 day intervals for 6 days of cultivation. The embryos were well washed with distilled water and then separated into four morphologically defined units: plumule, hypocotyl, radicle, and cotyledon. Each was homogenized with ice-chilled distilled water. Acid soluble and lipid fractions were removed by the technique of Schneider[3]. P.N.A. was extracted with cold 1 N $HClO_4$ by the method of Ogur and Rosen[1] and P.N.A.-P was determined as inorganic phosphorus by Fiske-Subbarow method[2]. The final residue after being treated with hot 1 N $HClO_4$ to remove desoxypentose nucleic acid, was estimated for protein-N according to Levy-Palmer's hypobromite-iodometric titration method modified by Yagi[3].

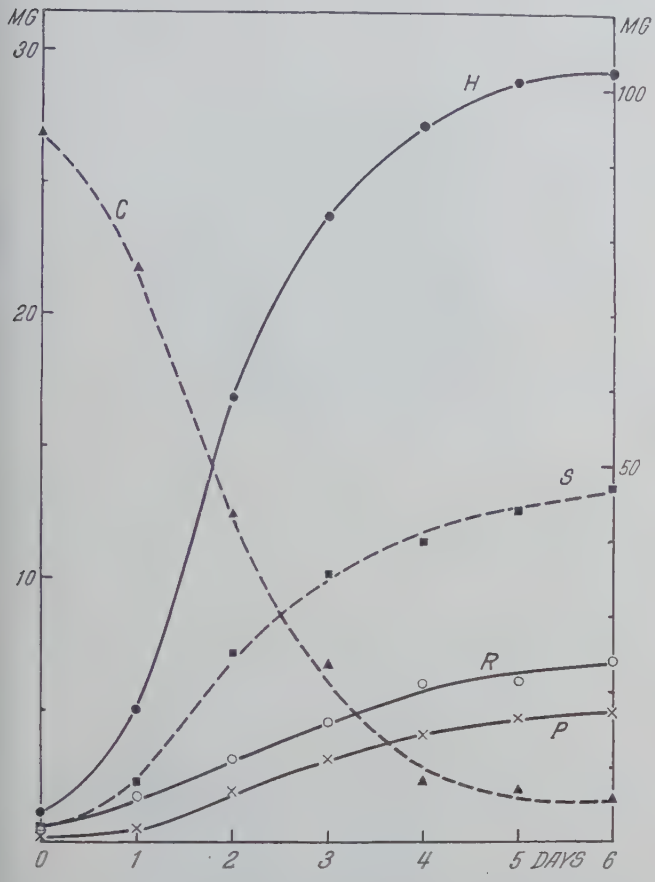


Fig. 1.—Changes in dry weight of embryonic organs of *Vigna sesquipedalis* during the germination stage: *P*, plumule; *H*, hypocotyl; *R*, radicle; *C*, cotyledon; *S*, seedling. Scale in the right ordinate, for *C* and *S*; the left, for *P*, *H*, and *R*.

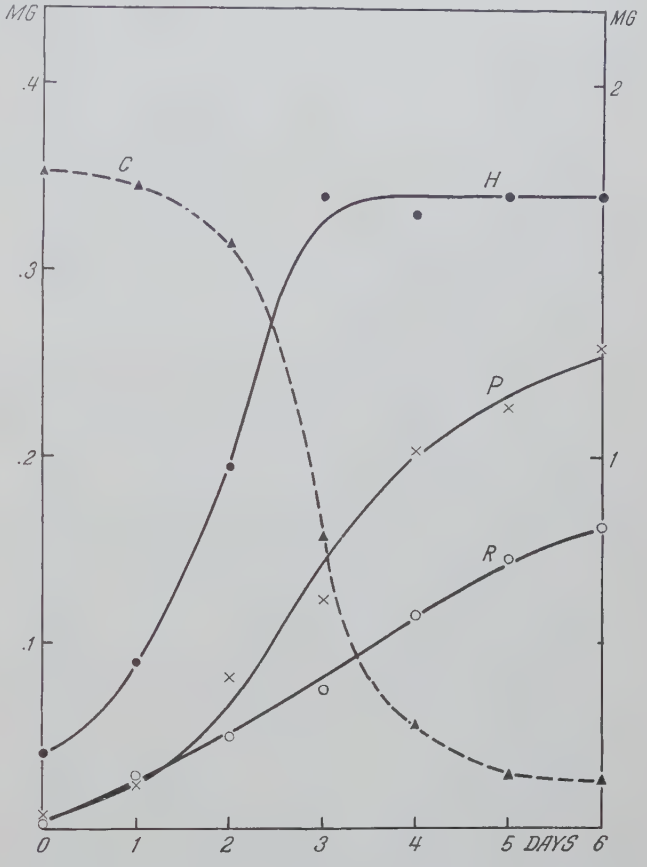


Fig. 2.—Changes in protein nitrogen content of embryonic organs of *Vigna sesquipedalis* during the germination stage. See text of Figure 1 for symbols used. Scale in the right ordinate, for Cotyledon; the left, for *P*, *H*, and *R*.

Figures 1, 2, and 3 show the changes in dry weight, protein-N, and P.N.A.-P for each organ during the course of germination stage[4]. From these figures it is evident that: (1) in the plumule, the P.N.A.-P content increases exponentially over the entire stage; dry weight and protein-N changes reveal essentially the same tendency as observed in P.N.A.-P change; (2) in the radicle, the amount of P.N.A.-P increases exponentially over the entire phase; dry weight and protein-N show almost the same behaviour as the P.N.A.-P; (3) in the hypocotyl, the amount of P.N.A.-P increases exponentially up to the 2nd day and declines rapidly from the 3rd day. Protein-N increases exponentially up to the 3rd day, and thereafter the amount is retained unchanged. On the other hand, dry weight change does not run parallel with P.N.A.-P- as well as protein-N changes and it

[1] J. Brachet, *Embryologie chimique*, 2nd edit. (Paris, 1947). – T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function* (New York, 1950).

[2] B. Malmgren and C. G. Hedén, Acta Path. Microbiol. Scand. *24*, 417 (1947).

[3] W. C. Schneider, J. biol. Chem. *161*, 293 (1945).

[1] M. Ogur and G. Rosen, Arch. Biochem. *25*, 262 (1950).

[2] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. biol. Chem. *66*, 375 (1925).

[3] Y. Yagi, in Egami, Nucleic acids a. Nucleoproteins, Tokyo *1*, 132 (1951).

[4] As the O-day old material seeds soaked for 5 h were employed,

increases exponentially throughout the germination stage; (4) in the cotyledon, the amounts of P.N.A.-P, dry weight, and protein-N simultaneously decrease rapidly with the elapse of time. It is worth while to point out that a large amount of P.N.A.-P is found in this *reserve organ* at the initial stage of germination.

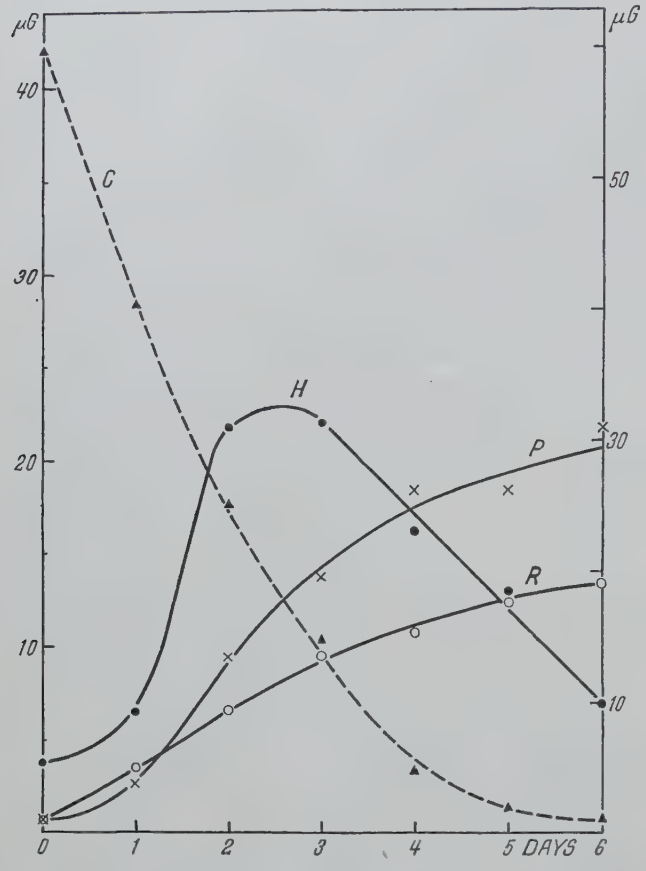


Fig. 3.—Changes in pentose nucleic acid phosphorus content of embryonic organs of *Vigna sesquipedalis* during the germination stage. See text of Figure 1 for symbols used. Scale in the right ordinate, for Cotyledon; the left, for *P*, *H*, and *R*.

Close parallelism between increase of P.N.A. and that of protein is thus demonstrated in all anabolic (growing) organs studied. This is most strikingly recognizable in the hypocotyl tissue in which the mode of growth is shown to change categorically from "division" to "elongation" at about the middle of the germination stage[1]. Increase of protein occurs only in the earlier half of the germination stage, while in the later half protein content remains practically constant; P.N.A. increase is observed only in the earlier half, and it begins to disappear as the protein increase ceases. The result seems to suggest that if P.N.A. is indeed involved in protein synthesis, then a synthesis rather than only existence or degradation of P.N.A. may be significant for the formation of protein. This view is thought to be supported by the several similar findings in animal and microbial materials[2]. In this connection, it is also a noticeable fact that in all the embryonic tissues except cotyledon, an approximately constant quantitative relationship between maximum contents of both protein-N and P.N.A.-P (*ca.* 14:1) was observed.

As for the unexpectedly high P.N.A. content of the cotyledon, the possible existence of reserve phosphates such as phytic acid, which, if present, would be removed by the cold trichloroacetic acid treatment in our fractionation procedure, may not be the cause of such high phosphorus value observed for the P.N.A. fraction. In the germination stage, the cotyledon tissue which is now catabolic in nature is practically deprived of any ability to produce P.N.A. Hence the existing P.N.A. would be the survival of what had been produced in the anabolic phase of the cotyledon in its earlier stage of development on the placenta. We believe that this is the first case in which a reserve organ is found to have such a large amount of P.N.A. even in its mature stage. The significance of this high P.N.A. content in the cotyledon is as yet obscure

S. Osawa and Y. Oota

Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University, Japan, December 4, 1952.

Zusammenfassung

In den embryonalen Geweben einer Hülsenpflanze, *Vigna sesquipedalis*, findet Zunahme an Proteingehalt stets zugleich mit Zunahme an Pentosenukleinsäuregehalt statt. Dies ist ein genau gleiches Verhalten, wie man ihm bereits bei Mikroben sowie bei tierischen Geweben begegnete. In den Kotyledonen (Reserveorgane) wird ein unerwartet hoher Gehalt an P.N.A. gefunden.

Colour Pattern and the Definition of the Species, *Diadema antillarum* Philippi

Six species have been distinguished in the echinoid genus *Diadema* (Humphreys, 1797) Gray[1]. Distinctions are maintained on the grounds of differences in the shape of the valves of the tridentate pedicellariae, the number of series of large tubercles in the interambulacral areas of the test and the colour pattern.

Mortensen[2] long ago urged that more attention should be directed to these colour differences, which mainly concern the disposition of blue areas on the black background of the test, on the grounds that herein may exist a clue to the interrelationships of the several species. Thus it is stated that the blue pattern of the genotype *D. setosum* (Leske) is very characteristic, consisting of isolated spots, whereas that of *D. antillarum* Philippi forms continuous lines, in the interambulacra. In *Diadema Savignyi* (Audouin) Michelin, a continuous blue ring around the periproct is described, which is stated to be absent in *D. antillarum*, etc.[3].

My own studies on the last form have shown that the distribution of the blue colour has been inadequately described and although I have not yet had the opportunity of examining any other species, in the case of

[1] Y. Oota, Science (Kagaku), Tokyo *23*, 60 (1953); Embryologia, Nagoya (in press).

[2] S. Osawa and Y. Hayashi, Science (Kagaku), Tokyo *23*, 34 (1953). – M. Fukuda and A. Sibatani, J. Biochem., Tokyo (in press). – S. Osawa (unpublished experiment). – W. H. Price, J. gen. Physiol. *35*, 741 (1952).

[1] Th. Mortensen, *A Monograph of the Echinoidea* (Reitzel, Copenhagen, 1940), p. 111.

[2] Th. Mortensen, U. S. Nat. Mus. Bull. Washington *74* (1910).

[3] Th. Mortensen, *A Monograph of the Echinoidea* (Reitzel, Copenhagen, 1940), p. 111; U. S. Nat. Mus. Bull. Washington *74* (1910).

D. antillarum, the distinctions drawn on the basis of the blue pattern are certainly not so well defined as previously maintained. Thus there are well marked colour changes[1], both physiological and morphological, which affect precisely those blue areas that have been accorded systematic significance.

Figs. 1 and 2.—Two views of *D. antillarum* showing the colour pattern which develops on the test in darkness.

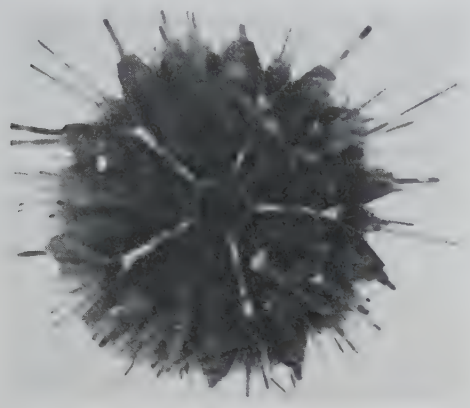


Fig. 1.—Aboral view of a young form photographed after being in total darkness for 3 h. The spines have been cut short. 2:1. Note that the pattern includes a ring around the periproct and that the ray-like portions of the pattern in the interambulacra are becoming obscured in parts by the spreading of pigment.

Fig. 2.—A lateral view of an adult after similar treatment but the spines remain intact. Note that the pattern is much less extensive, being restricted to a configuration resembling a lancet arch in the ambital and supra-ambital region of the interambulacrum. Note the lines of the pattern becoming irregular and broken up by the spreading of melanin. ¼:1.

The physiological colour change, which is due to the dispersion and concentration of melanin in superficial chromatophores[2], as previously reported is related in part at least to environmental lighting, young forms which have been in darkness for several hours showing a striking white pattern (Fig. 1) around the periproct and in the spineless areas of the interambulacra (i.e. in those areas which at other times may appear blue). The pattern is the result of reflection from iridophores[1] situated in the white areas, which are uncovered in darkness owing to the concentration of melanin in the surrounding chromatophores, but as the melanin spreads over the top of them on continued exposure to light, the light reflected by the iridophores becomes increasingly dispersed and a brilliant blue colour results. The white pattern is thus the precursor of the blue.

At first the blue areas form continuous lines, but as the spreading of the melanin continues, the lines disintegrate into irregular spots which become smaller and eventually disappear as the test assumes a uniform black colour. The beginning of this process can be seen in Figures 1 and 2.

The supposedly characteristic blue pattern in *D. antillarum* is thus not a constant feature, for it may take the form of continuous lines or isolated spots, the periproct ring may be present or absent and in some cases the pattern may not appear at all. Its extent and form clearly depend on the degree of dispersion of melanin, in turn dependent on environmental lighting and on an inherent rhythm[2]. The pattern also varies with age, for both red and black pigments accumulate and may obliterate portions of it.

When dispersed, the melanin has a further effect, for it acts not only as a light diffractor but also as an absorber. Thus an urchin appearing uniformly black in ordinary daylight may show the blue pattern when transferred to brilliant sunlight, presumably because all the light is not absorbed by the superficial melanin, some of it penetrating through to become reflected back from the iridophores and further dispersed by the pigment. Here again the extent to which this occurs depends on the amount of melanin and the degree to which it is spread, both of which are continually varying.

It is therefore necessary to be cautious in using the blue pattern of *D. antillarum* as a specific character, for whatever its value in the diagnosis of other species of the genus, it is too variable in the West Indian species to permit simple distinctions to be drawn, and any attempt to use it must take into consideration not only individual variations, but also age, environmental lighting, and rhythmic changes in the dispersion and concentration of melanin.

N. Millott

Department of Zoology, University College of the West Indies, Jamaica, B.W.I., November 27, 1952.

Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass der Seeigel *Diadema antillarum* sich von ihm nahestehenden Arten in mehreren Merkmalen einschliesslich des blauen Farbmusters auf der Schale unterscheidet, welches die Form von Linien (keine Flecken) besitzt und keinen Ring um das Analfeld bildet. Der morphologische und physiologische Farbwechsel, der kürzlich entdeckt wurde, beeinflusst diese blauen Zonen und macht diese besondere Unterscheidung unhaltbar in ihrer ursprünglichen Fassung. Jeder Versuch, das Farbmuster als ein spezifisches Merkmal zu verwerten, muss eine Reihe von Eigenschaften mit in Rechnung stellen, wie Alter, Beleuchtung der Umgebung und rhythmische Veränderungen der Melanophoren selber.

[1] N. Millott, Nature (in press).
[2] N. Millott, Nature *170*, 325 (1952).

[1] N. Millott, Nature *170*, 325 (1952).
[2] N. Millott and F. W. Jacobson, J. Invest. Dermat. *18*, 91 (1952).

Untersuchungen zur Klärung der Leistungsspezifität verschiedener abnormer Induktoren bei der Embryonalentwicklung der Urodelen[1]

Zur Klärung der sich vielfach widersprechenden Ergebnisse bei Experimenten mit abnormen Induktoren[2] wurden in den Jahren 1949–1951 die Induktionsleistungen verschiedener tierischer Gewebe im Einsteckexperiment auf breiter Basis geprüft. Als Implantate dienten Niere, Leber, Herz, Parotis und Thymus vom Meerschweinchen, ferner Niere und Leber der weissen Maus sowie Leber von *Triturus vulgaris*; die Organstückchen wurden nach unterschiedlich langer Alkoholfixierung in das Blastozöl früher Gastrulae von *Tr. vulgaris* und *Tr. helvet.* eingesteckt. Um unsere Ergebnisse statistisch sichern zu können, haben wir möglichst viele Operationen, das heisst etwa 80 je Serie, ausgeführt. Den vorliegenden Befunden liegt eine Zahl von etwa 9000 Operationen, davon etwa 7000 verwertbare Fälle, zugrunde.

Bei der Prüfung der Implantate wurde insbesondere die Wirkung verschieden langer Alkoholbehandlung (70%) untersucht, da hierdurch die Gewebe eine tiefgreifende stoffliche Veränderung erfahren, welche das Induktionsergebnis beeinflussen könnte. Ausserdem wurde die Bedeutung des Ernährungszustandes der Spendertiere geprüft. Um eine mögliche Beteiligung der Ribonukleinsäure beim Induktionsvorgang festzustellen, wurde eine grosse Anzahl verschiedener Implantate mit Ribonuklease behandelt.

Nach fast vollständiger histologischer Auswertung unseres Materials liegen bisher folgende Befunde vor:

1. Bei kurzfristiger Alkoholbehandlung der Implantate (3–5 h) haben wir zwei Gruppen von Induktoren mit grundsätzlich unterschiedlicher Induktionsleistung gefunden: Niere, Thymus und Parotis vom Meerschweinchen sowie Mäuseniere erwiesen sich als Induktoren mit stark deuterenzephal-spinokaudaler Wirkung, während Meerschweinchenleber und -herz sowie Mäuse- und Triturusleber eine ausgesprochen archenzephal-deuterenzephale Induktionsleistung aufweisen.

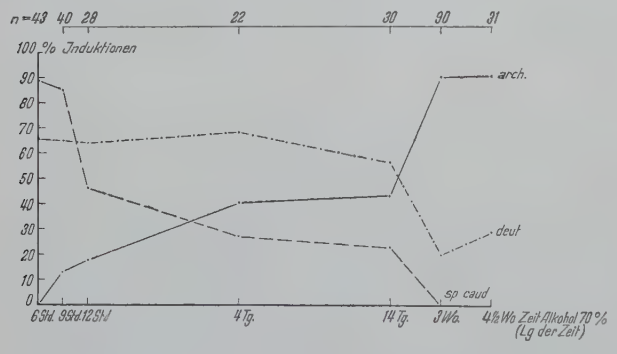


Abb. 1. Induktionsleistungen der Mäuseniere nach verschieden langer Alkoholeinwirkung.
(In allen Abb. n = Zahl der Fälle mit Induktionen.)

Bei länger dauernder Alkoholeinwirkung (bis zu 4 Wochen) erfährt die Induktionsleistung der deuterenzephal-spinokaudalen Gruppe eine wesentliche Veränderung (Abb. 1). Die Zahl der spinokaudalen Induktionsgebilde nimmt mit zunehmender Alkoholbehandlung ständig ab, während gleichzeitig archenzephale Induktionsgebilde neu auftreten. Letztere nehmen im gleichen Masse zu, wie die spinokaudalen abnehmen. Sie erreichen ihren höchsten Wert nach dem völligen Verschwinden der spinokaudalen. Die deuterenzephalen Gebilde erfahren ebenfalls eine Verminderung, die aber erst nach längerer Alkoholbehandlung in Erscheinung tritt. Die hohe archenzephale Induktionsleistung der archenzephal-deuterenzephalen Gruppe bleibt durch die Alkoholbehandlung praktisch unberührt (Abb. 2). Die spinokaudalen Gebilde machen in allen Serien nur einen geringen Prozentsatz aus, während die deuterenzephalen einen schwachen Abfall zeigen.

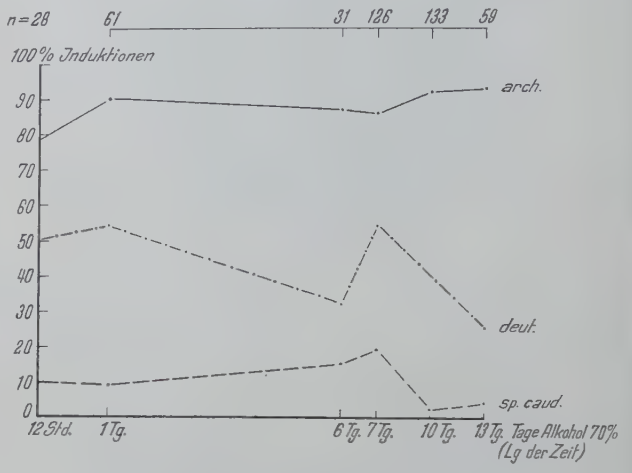


Abb. 2. Induktionsleistungen der Meerschweinchen-Herzmuskulatur nach verschieden langer Alkoholeinwirkung.

2. Der Einfluss des Ernährungszustandes auf das Induktionsergebnis wurde bei verschiedenen Organen untersucht. Erwartungsgemäss waren die Veränderungen am deutlichsten bei solchen Organen, deren physiologischer Zustand durch den Hunger am stärksten verändert wird, zum Beispiel bei Leber, Parotis und Niere, während Herzmuskulatur keine Leistungsverschiebung erfährt (Abb. 3).

Fortschreitender Hunger bewirkt ansteigende archenzephale und abnehmende spinokaudale Induktionsleistungen. Die Häufigkeit der deuterenzephalen Gebilde wird durch den Hunger nicht betroffen. Die Veränderungen treten nach zweitägigem Hunger am deutlichsten hervor[1].

3. In den Fermentserien wurde kristallisierte Ribonuklease[2] in verschiedenen Konzentrationen (1:10000 bis 1:2500 in doppelt destilliertem Wasser), bei verschiedenen Temperaturen (20–40°C) und unterschiedlicher Einwirkungsdauer (2–6 h) verwandt. Die Kontrollen wurden unter denselben Bedingungen nur mit doppelt destilliertem Wasser behandelt.

Nach den Befunden von Brachet[3], der nach Ribonukleasebehandlung (2 h bei 65°C) eine Auslöschung der «neuralen» Induktionsgebilde erhalten hatte, erwarteten wir zumindest für die archenzephalen Gebilde dasselbe Ergebnis. Unter den von uns angewandten Versuchsbedingungen, bei welchen nicht die Gefahr besteht, dass allein durch eine zu hohe Temperatur eine Fermentwir-

[1] Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Grund einer Anregung von E. Rotmann begonnen und nach dessen Tod im September 1950 unter der Förderung von O. Kuhn weitergeführt.

[2] H.-H. Chuang, Roux' Arch. *139*, 556 (1939); *140*, 25 (1940). – S. Toivonen, Ann. Acad. Sci. Fenn. [A] *55*, 6 (1940). – E. Rotmann, Naturwissenschaften *30*, 60 (1942).

[1] S. Toivonen, Arch. Soc. «Vanamo» *6*, 1, 63 (1951).

[2] Armour Laboratories, Chicago, USA.

[3] J. Brachet, Acta biol. Belg. *1*, 16 (1942).

kung vorgetäuscht wird, waren die Resultate aber grundsätzlich anderer Art: Die Gesamtrate der archenzephalen Gebilde blieb gegenüber den Kontrollen stets gleich oder wurde sogar in unterschiedlichem Masse erhöht (Abb. 4). Eine detaillierte Betrachtung der verschiedenen archenzephalen Gebilde ergab, dass in allen Fermentserien die «starken» archenzephalen Organe (Hirnteile, Augen und Nasen) deutlich vermehrt, während die Zahl der «schwachen» (freie Linsen, Lentoide, Balancer und Epidermisverdickungen) wechselnd beeinflusst, oft auch vermehrt wurden. Wir glauben, nach diesen Befunden von einer echten Erhöhung der archenzephalen Induktionsleistung nach Ribonukleasebehandlung sprechen zu können. Das Vorkommen der spinokaudalen und deuterenzephalen Gebilde lässt keine gesetzmässigen Veränderungen erkennen.

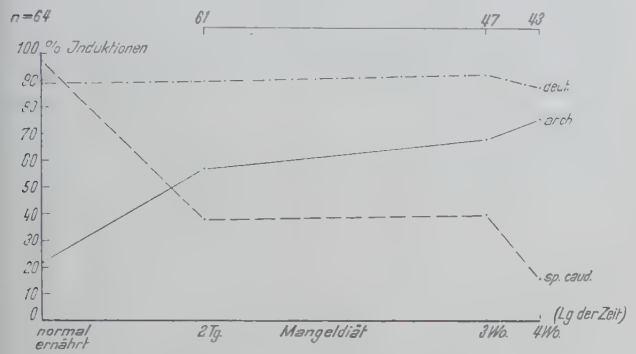


Abb. 3. Induktionsleistungen der Meerschweinchen-Parotis in Abhängigkeit vom Ernährungszustand.

Unsere Befunde scheinen die bisher vorliegenden Vermutungen[1] über die Natur der Induktionsstoffe zu bestätigen. Denaturierung und Abbau gewisser Proteine durch Alkoholbehandlung und Hunger sowie die damit Hand in Hand gehende Auslöschung der spinokaudalen Induktionsleistung sprechen für den Proteincharakter des spinokaudal wirksamen Agens.

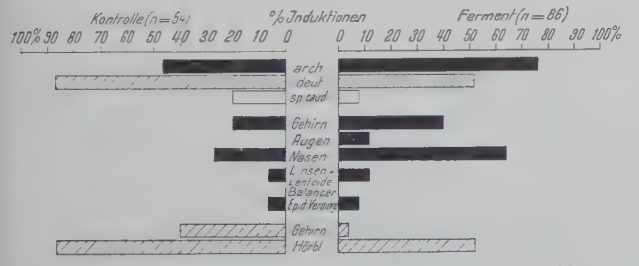


Abb. 4. Induktionsleistungen der Mäuseniere nach Ribonukleasebehandlung (1:2500; 2 h; 40° C).

Das Verhalten der archenzephalen Induktionen im Hunger- und Fermentversuch deutet darauf hin, dass weniger die hochpolymere Ribonukleinsäure als vielmehr deren Spaltprodukte für das archenzephale Induktionsgeschehen von Bedeutung sind; denn durch Hunger werden Abbauprozesse der Ribonukleinsäure eingeleitet, ebenso durch Ribonukleasebehandlung, welche bei unseren Versuchen wahrscheinlich nicht bis zu den letzten, nicht mehr induktionsfähigen Bestandteilen geführt hat. Diese Abbauprodukte könnten auf Grund ihres besseren Diffusionsvermögens vom Induktor in das Reaktionsmaterial die Steigerung der archenzephalen Induktionsleistung in den Fermentserien bewirkt haben.

H. Engländer,
A. Gisela Johnen und W. Vahs

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 15. August 1952.

Summary

Various animal tissues were tested for their capabilities as inductors in implantation experiments. After being fixed in alcohol for a short time (few hours), parotis, kidney, and thymus of the guinea pig, as well as the kidney of the white mouse (Series I), proved to be specifically deuterencephalic-spinocaudally acting inductors, whereas the liver and heart of the guinea pig, and the liver of mouse and Triturus (Series II), showed themselves as specifically archencephalic-deuterencephalic inductors.

If the affection by alcohol is prolonged (up to 4 weeks), the deuterencephalic-spinocaudal effect is gradually lost in series I, while new archencephalic structures come into existence.

The tissues of series II, however, retain their archencephalic-deuterencephalic effect. The action of the tissues tested, except that of the heart muscle, changes in the same way when the animals are subjected to a starvation diet for several weeks. The archencephalic rate of induction increases while the spinocaudal rate decreases in proportion. In all the tissues tested, the capacity of archencephalic induction can be increased by treatment with ribonuclease.

Dynamic State and Half Life Time of Human Serum Cholinesterase

An important biological concept evolved in recent years is that of the dynamic state of the body constituents. Formerly, for example, for one of these, the body proteins, semi-static stores were implied from which proteins were removed by catabolism and to which the anabolism of the body supplied replacements. Actually, Schoenheimer[1] has demonstrated, using the isotope technique, that there is a regular, continuous, dynamic interchange of the body elements in which there is concurrent synthesis and degradation.

One method employed illustrates the general isotope approach: an amino acid, for example, glycine, labeled with radioactive N^{15}, is administered to the animal. Various proteins are then collected at periodic intervals, isolated, and quantitatively studied as to isotope concentration per unit weight of protein. The peak for the incorporation of the glycine is reached shortly following cessation of administration, following which a decline occurs. This corresponds to the disappearance through degradation of the isotope labeled protein molecules. The rate of decline indicates a constant replacement of the labeled with newly synthesized unlabeled molecules. This is illustrated in Figure 1. It is customary to denote the average time of replacement of these molecules as the half life time of the particular protein being studied.

We are interested in an enzyme, pseudocholinesterase, which is found in human serum, and which we have

[1] F. E. Lehmann, *Einführung in die physiologische Embryologie* (Verlag Birkhäuser, Basel 1945), S. 319 ff. – S. Toivonen, Rev. suisse Zool. *57*, 41 (1950). – T. Kuusi, Ann. Zool. Soc. zool.-bot. Fenn. «Vanamo» *14*, 4, 1 1951).

[1] R. Schoenheimer, *The Dynamic State of the Body Constituents* (Harvard University Press Cambridge, Mass., 1942).

reported[1] to have some quantitative relationship to serum albumin in the human. If we could relate the rate of synthesis of this enzyme to that observed for albumin by the isotope method, we would have a further means of understanding the relationship of the two. Until now, the semi-static concept of the state of the pseudocholinesterase has assumed that it is synthesized in the liver and is then transferred to the blood stream as needed to maintain a constant blood level.

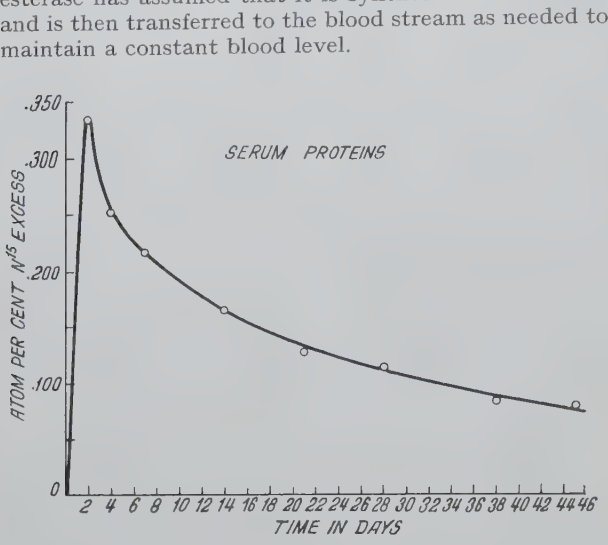


Fig. 1.—N^{15} concentration in serum proteins after feeding N^{15} labeled glycine for 2 days. The slope of the curve from the peak concentration of the labeled protein to its minimum value indicates the rate of destruction of serum protein. [After I. M. London, in *Plasma Proteins*, ed. by J. B. Youmans (Thomas, Springfield, 1950)].

For the present it is impossible to utilize the isotope method for serum cholinesterase, since the procedure is of value only if the enzyme may be purified considerably. This has as yet not been accomplished with any success. We have, however, arrived at another method for determining the same information so dramatically illustrable through the isotope procedure. It has been demonstrated that serum cholinesterase is inhibited by a number of chemical substances including Di-isopropyl Florophosphate (D.F.P.), a relatively irreversible[2] inhibitor. *In vivo*, the administration of this drug is followed by the rapid disappearance, amongst other things, of serum cholinesterase followed by its immediate regeneration[3]. The rate of this regeneration indicates the same information as to the dynamic state of this particular protein which the isotope has given for other tissue elements. Because of a constant level of this enzyme in the human over a long period of time, the rate of reappearance of the enzyme would actually indicate the time and quantity of the regular synthesis of the molecules. Since the experiment in humans offers some difficulty, it has been possible to secure data for this regeneration from other sources and this is presented in Figure 2.

Medhod. The data of four groups of investigators have been examined statistically. Series number one[4] consists of 13 normal individuals who received 2 mg of D.F.P. in peanut oil intramuscularly. Series number two[1] consists of 35 subjects, 25 of whom were normal convalescents and ten with myasthenia gravis. 5 tenths of 3 mg of D.F.P. were administered intramuscularly or 0·5 to 2 mg in aqueous solution was given intra-arterially. Series number three[2] consists of 8 normal subjects with determinations on the 4th, 8th, and 15th day and 9 subjects on the first day. D.F.P. was administered through vapor inhalation. Series number four[3] consists of 6 subjects who were given 2 to 3 mg of D.F.P. intramuscularly in peanut oil. In all of these the standard Warburg technique was employed to determine serum cholinesterase. Determinations were made immediately following cessation of D.F.P. administration at which initial point the serum cholinesterase had disappeared almost completely from the serum. For the data of Grob *et al.*[4] and Mazur and Bodansky[2], the curves are plotted from tables included in their papers. The data of Wescoe *et al.*[5] consists of replotting the curve included

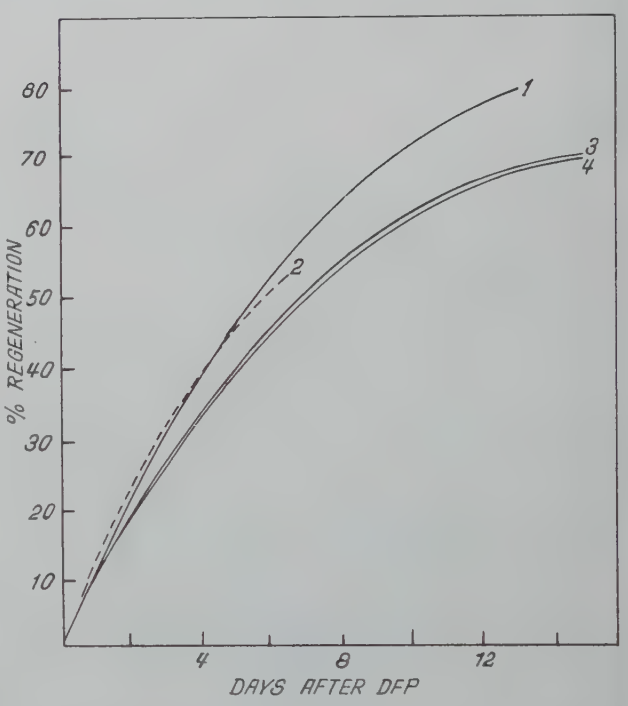


Fig. 2.—Regeneration of human serum cholinesterase following the administration of D.F.P. Curve No. 1 from the data of Wescoe *et al.*[5]. Curve No. 2 from the data of Lilienthal *et al.*[1]. Curve No. 3 from the data of Mazur and Bodansky[2]. Curve No. 4 from the data of Comroe *et al.*[3].

in their paper so that the values are determined as percent regeneration rather than actuel serum cholinesterase activity readings. The curve obtained from

[1] M. G. Levine and R. E. Hoyt, Science *111*, 286 (1950). – M. G. Levine and A. A. Suran, Proc. Sco. Exp. Biol. Med. *79*, 686 (1952).
[2] A. Mazur and O. Bodansky, J. Biol. Chem. *163*, 261 (1946).
[3] A. Mazur and O. Bodansky, J. Biol. Chem. *163*, 261 (1946). – W. C. Wescoe, C. H. Carlton, W. F. Riker, and I. C. Litt, Amer. J. Phys. *149*, 549 (1947). – D. Grob, J. L. Lilienthal, A. M. Harvey, and B. F. Jones, Bull. Johns Hopkins Hosp. *81*, 217 (1947).
[4] W. C. Wescoe, C. H. Carlton, W. F. Riker, and I. C. Litt, Amer. J. Phys. *149*, 549 (1947).

[1] D. Grob, J. L. Lilienthal, A. M. Harvey, and B. F. Jones Bull. Johns Hopkins Hosp. *81*, 217 (1947).
[2] A. Mazur and O. Bodansky, J. Biol. Chem. *163*, 261 (1946).
[3] J. H. Comroe, J. Todd, and G. B. Koelle, J. Pharm. Exp. Ther. *87*, 281 (1946).
[4] D. Grob, J. L. Lilienthal, A. M. Harvey, and B. F. Jones, Bull. Johns Hopkins Hosp. *81*, 217 (1947).
[5] W. C. Wescoe, C. H. Carlton, W. F. Riker, and I. C. Litt, Amer. J. Phys. *149*, 549 (1947).

the data of COMROE and his co-workers[1] has been constructed from Table 3 taken from that paper.

From Figure 2 we observe the following: There is a relatively close resemblance between the data of the four separate experimental groups. The curve for the regeneration is exponential and similar to those obtained through isotope studies. It may be concluded, therefore, that this enzyme exists in the body in the same dynamic state as, for example, serum albumin. We may from these curves also obtain the half life time of the enzyme, approximately 6–7 days. This may be compared with the reported[2] half life time value for serum albumin of 20 days obtained for normal man. Actually, the half life time obtained with the D.F.P. procedures is not strictly comparable to that gotten from the isotope method. We are at present attempting a mathematical formulation which will make it possible to translate one into the other. This paper has been presented, since it offers a new method for determining the dynamic state of an enzyme. The data for serum cholinesterase has been presented above, but the procedure may be used generally for such determinations with other enzymes. With D.F.P., important information may be obtained not only for serum cholinesterase, but for true cholinesterase as it occurs in many tissues.

M. G. LEVINE

Kabat-Kaiser Institute, Vallejo, California, November 29, 1952.

Zusammenfassung

Eine Methode wird dargestellt, mittels welcher das dynamische Verhalten und die Halblebenszeit eines Enzyms berechnet werden kann. Es wird ein Inhibitor hinzugefügt und nachher die Regeneration, *in vivo*, bestimmt. Das Enzym ist «Pseudocholinesterase» und der Inhibitor ist Di-isopropyl-Floro-phosphate.

[1] J. H. COMROE, J. TODD, and G. B. KOELLE, J. Pharm. Exp. Ther. *87*, 281 (1946).

[2] I. M. LONDON, D. SHEMIN, R. WEST, and D. RITTENBERGER, J. Biol. Chem. *179*, 463 (1949).

Host Resistance to Tumor Implantation, its Alteration and Relationship to the Individual Metabolic Pattern[1]

We have been working in this laboratory for several years with a transplantable fibrosarcoma, the implantation incidence of which was relatively low in a closely-bred strain of SHERMAN rats. An attempt to explain this low incidence led to the consideration of a number of possible causes.

If, for any reason, transplanted fragments do not possess a comparable potential of active cells, due to variation within the tumor stock itself, or if certain variables in the technique of grafting are not adequately controlled, one may expect a lowered incidence. On the other hand, it is plausible to assume, the tumor stock and variations in technique being controlled, that some individuals are more susceptible than others to a tumor implant. Under such conditions, one should be able, by challenging with grafts, to segregate tumor-resistant from tumor-susceptible animals. With such groups available, a new approach to the problem of the nature of resistance to cancer becomes possible through a comparative study of the metabolism of these respective groups of animals.

Our first efforts were, therefore, concerned with establishing a reliable tumor transplantation technique and eliminating possible variation within the tumor stock. An early study[1] showed that the age of the host bearing a stock tumor had a distinct effect on viability of the tumor. It was demonstrated that when rats were implanted with tumors at the age of 10–15 days, the tumors which developed within 2–3 weeks were better for transplantation purposes than those grown in older animals. Such tumor stocks from young animals were subsequently used. It was also shown that all portions of such tumors are equally viable[2]. By propagating the tumor in young animals at regular intervals, and utilizing stocks of the proper age, variations within the tumor stock have been definitely controlled.

The methods for handling the tumor during the process of grafting have likewise been carefully standardized. Grafting is carried out in a constant-temperature room at 24°C, which was shown to be more favorable to viability than 37°C. Graft size, within a certain range, is a critical factor, but it can be controlled so that implantation incidence following replicate grafting with fragments from the same or similar stock tumors in the same animals does not differ significantly[3]. As a matter of fact, segregation of resistant from susceptible animals has been achieved by challenging with quadruple grafts.

Other studies, in which standard techniques and tumor stocks were used, showed that the resistance to implantation of a significant number of individuals within an experimental group may be affected by specific factors and that it can be altered by nutritional means. Age of individuals receiving grafts is a determining factor[4]. Dietary supplementation with pyridoxine favors implantation[5], as does supplementary administration of thymic extracts[6]. Phenylalanine supplements, however, lowers incidence of successful implants[7], while riboflavin has no effect on incidence, but does affect growth of the tumor after implantation[8].

Having shown that resistant animals can be segregated from susceptible ones and that dietary supplementation can alter resistance, it is of interest to know what may be the physiological basis for the phenomenon of resistance.

It would seem that implantation and growth of tumors, being subject to nutritional control, constitutes another case of what is characterized as "genetotrophic" diseases by R. J. WILLIAMS *et al.*[9]. Individual and strain variation in regard to tumor susceptibility may simply be an expression of metabolic pattern variation. Quantitative analytical determination of the constituents of representative body fluids, such as urine, have revealed that

[1] Presented at the Second International Congress for Biochemistry (Section on Cancer), Paris, July 1952. Aided by a grant from the Damon Runyon Memorial Fund.

[1] J. B. LOEFER, Cancer *5*, 163 (1952).

[2] J. B. LOEFER, R. B. MEFFERD, Jr., and R. M. NETTLETON, Jr., Texas Rep. Biol. Med. *10*, 598 (1952).

[3] R. B. MEFFERD, Jr. and J. B. LOEFER, Texas Rep. Biol. Med. *10*, 608 (1952). – J. B. LOEFER and R. B. MEFFERD, Jr., Cancer *1953* (in press).

[4] J. B. LOEFER and N. G. GILLES, Cancer *4*, 1259 (1951). – J. B. LOEFER, Cancer *5*, 163 (1952).

[5] J. B. LOEFER, Can. Res. *11*, 481 (1951).

[6] J. B. LOEFER and N. G. GILLES, Texas Rep. Biol. Med. *9*, 571 (1951).

[7] J. B. LOEFER and R. B. MEFFERD, Jr., Texas Rep. Biol. Med. *10*, 614 (1952).

[8] R. B. MEFFERD Jr. and J. B. LOEFER, Texas Rep. Biol. Med. *10*, 619 (1952).

[9] R. J. WILLIAMS *et al.*, Biochem. Inst. Studies. IV. Univ. Texas Publ. 5109, 205 pp. (1951).

there are marked and constant differences in the quantities of materials excreted–differences which may be as great as 1500%. These workers have correlated certain individual metabolic patterns, particularly those involving vitamin deficiencies, with certain diseases and have shown that these may be successfully treated by dietary supplementation, i.e., they are genetotrophic. They report the extremely encouraging conclusion that even though a physiological condition rests upon hereditary roots, a nutritional attack may be successful in modifying or alleviating it.

Utilizing this concept, we have determined the quantities of more than twenty compounds present in the urine of tumor-susceptible and -resistant rats. Daily and long range excretion variation has been compensated for by pooling five 24-hour urine specimens per individual rat, and repeating the procedure a second time two months later. Quantitative determinations in replicate were made upon each of these two pooled individual samples. Values obtained were corrected for the weight of individual rats so as to make comparisons possible. The number of grams of feed required to be consumed per rat to yeld an excretion of one milligram of a given substance was determined. The Table presents typical data for a single substance (leucine), and serves to illustrate the method employed.

Utilizing the median value for each compound excreted, animals may be ranged according to whether they excrete more or less than this "normal" value. Reported in this manner, it is possible to differentiate most of the susceptible animals by utilizing singly any one of several compounds. These separations are statistically significant, but in each case one or two animals demonstrate aberrant behavior, such that it is impossible to use the results of a single determination. The difference becomes much more striking, however, when several compounds are considered simultaneously.

J. B. Loefer and R. B. Mefferd Jr.[1]

From the Southwest Foundation for Research and Education, and Trinity University, San Antonio, Texas, U.S.A., November 18, 1952.

Evaluation of leucine excretion as a means of differentiating between tumor-resistant and tumor-susceptible rats.

Weight in grams*	Milligrams leucine excreted per rat per day	Grams feed consumed per day	Corrected leucine excreted per day**
Susceptible rats			
322	0·26	25·7	88·6
401	0·29	28·3	108·8
351	0·24	26·3	105·2
497	0·33	35·4	147·5
368	0·23	25·1	109·1
450	0·26	25·7	121·4
329	0·24	26·6	98·5
			$\bar{x}_1$=111·3
Resistant rats			
305	0·27	23·6	73·8
369	0·26	29·2	112·3
405	0·28	27·6	110·4
378	0·29	25·2	90·0
335	0·29	24·1	75·3
270	0·26	17·6	50·3
340	0·25	27·4	101·5
406	0·32	28·1	96·9
280	0·27	23·6	67·4
357	0·33	25·8	75·9
364	0·29	25·8	89·0
			$\bar{x}_2$ - 85·7

* Median weight: 364 (weighted to equalize classes).
** Grams feed consumed per day per individual

$$\text{(milligrams leucine excreted per day per rat)} \left(\frac{\text{median weight}}{\text{individual weight}}\right)$$

$x_1 - x_2 = 25{\cdot}6$; $n_1 = 7$, $n_2 = 11$; d. f. = 16; $S x^2 = 6387{\cdot}7$; $t = 2{\cdot}66$, $P < 0{\cdot}02$; significant at $P < 0{\cdot}03$ level by median test[1].

[1] A. M. Mood, *Introduction to Theory of Statistics* (McGraw-Hill, New York, 1950), pp. 394.

Zusammenfassung

Es wurde ein Fibrosarkom der Ratte transplantiert, welches sich nicht in allen Tieren der Sherman-Rasse einpflanzen lässt. Über zwanzig Komponenten des Urins von sowohl resistenten wie auch von empfänglichen Tieren wurden analysiert. Die statistische Behandlung der Resultate zeigte, dass bei Tieren aus gleicher Zucht deutliche quantitative Unterschiede in den Urinanalysen existieren. Die Leuzinausscheidung in einem Versuch mit 18 männlichen Ratten übertraf bei den empfänglichen Tieren um 30% diejenige der resistenten von demselben Alter ($P < 0{,}02$). Auch die Ausscheidung anderer Komponenten ist bei den Empfänglichen verschieden von der resistenter Tiere.

[1] Post-Doctoral Fellow in Cancer Research of the Damon Runyon Memorial Fund.

Mammalian Specificity of Fibrinogen

There is no uniformity in the results of investigations concerning the antigen properties of fibrinogens. In some papers[1] considerable differences were reported between fibrinogens of different animals, in others[2] a limited relationship was demonstrated between the fibrinogens of some mammals, while in a third group of papers[3] the relationship is stated to be rather remote. It seems important to clarify this problem both from a theoretical and from a practical point of view. By the fractionation of human plasma different derivatives of fibrinogen are prepared which are successfully used in therapy in different lines of medical practice. The extensive use of these products, however, could not be realized, owing to the fact that they are produced from *human* plasma, a raw material available only in limited amounts, and–in spite of voluntary donors—very expensive. In addition the fibrinogen level in human plasma is very low, and a continous production of the therapeutic derivatives cannot easily be organized. Hence, different substitutes are used such, as gelatina-foam, oxidized cellulose, polyethylen, etc., which are unable to compensate natural proteins in the organism. Since all fibrin products are derivates of fibrinogen, first of all the antigen properties of fibrinogen were studied.

Materials and methods

Preparation of fibrinogen from mammalian and fowl plasma. Fibrinogen was prepared by Laki's method[4].

[1] T. Astrup and S. Darling, Acta Physiol. Scand. *3*, 311 (1942); *4*, 45 (1942).

[2] H. B. Kenton, J. Immunol. *25*, 461 (1933).

[3] K. Kato, Mitt. med. Ges. Tokio *36* (1922); Ref. Zbl. Bakt. Ref. *75*, 353 (1924). – L. Keszty͡us, T. Szilágyi, I. Nikodémusz, and T. Jávor, Acta Physiol. Hung. *1*, 100 (1950).

[4] K. Laki, Z. Physiol. Chem. *273*, 95 (1942).

Table I
Precipitin reactions of fibrinogen antisera with homologous and heterologous fibrinogens.

Fibrinogen-antiserum	Antigens: Fibrinogen					
	Beef	Swine	Horse	Sheep	Human	Fowl
Beef	1:1000+	1:500 +	1:250 +	1:250 +	1:500 +	–
Swine	1:1000+	1:2000+ +	1:250 +	1:1000+	1:1000+	–
Horse	1:1000+	1:500 +	1:2000+	1:500 +	1:250 +	–
Sheep	1:250 +	1:500 +	1:250 +	1:2000+ +	1:2000+	–
Human	1:500 +	1:250 +	1:250 +	1:250 +	1:2000+	–
Fowl		–			–	1:150 +

The principle of the method is the following: after repeated fractionating of the plasma with ammonium sulphate, fibrinogen is adsorbed to a gel of tricalciumphosphate, and then eluated in a phosphate buffer. Crystallization of fibrinogen is induced by properly diluting the eluate. Then the crystalline sediment is dissolved in a slightly alkaline (pH 7·5) sodium chloride solution, and it is made free from phosphate and ammonia residues by dialysis against 2% NaCl. Finally fibrinogen is dried from the frozen state. The method was worked out for preparation of swine fibrinogen and it was applied in our experiments in the preparation of fibrinogen of beef, swine, horse, sheep and man on the one hand, and fowl on the other hand.

Estimation of the purity of fibrinogen solution. On the day of the experiment 0·20 g of the dried, lyophilized powders were dissolved in distilled water and the solutions were filtered using SCHLEICHER-SCHÜLL filter paper No. 189. The total protein nitrogen was estimated by micro-Kjeldahl method, and the fibrinogen-nitrogen after clotting (after complete transformation of fibrinogen into fibrin) as fibrin-nitrogen, providing a possibility to remove molecules other than fibrin easily from the meshes of the fibrin-net[1]. The purity of fibrinogens (clottable protein-N in % of the total protein-N) used in our experiments amounts to 96·8% in the beef, 98% in the swine, 91% in the horse, 90% in the sheep, man and in fowl. The concentrations of the fibrinogen solutions used in the experiments were: beef 4·67 mg/ml, swine 4·18 mg/ml, horse 3·23 mg/ml, sheep 5·9 mg/ml, man 4·0 mg/ml, fowl 2·3 mg/ml.

Immunization and anaphylaxis experiments. With each of the six aforementioned fibrinogens 3–3 rabbits of 3000–3500 g weight were immunized. Every third day the animals were injected with increasing dosages of the fibrinogen solutions, altogether with 6 injections, containing totally 70–80 mg fibrinogen. Immunization was well tolerated by the animals, without any loss of weight. Seven days after the last immunizing injection, blood was taken. The precipitin tests were carried out by the layer method, reading after one hour at room temperature. Anaphylaxis experiments were carried out with 60 pigeons, using GAHRINGER's method[2] and with guinea pigs. The pigeons were given intravenously 1 ml fibrinogen solution; after a fortnight "reinjection" of fibrinogen was given again intravenously (1 ml). Anaphylactic symptoms were manifested within 1–4 min, consisting of lacrimation, mucuous discharge from mouth and nostrils, sneezing, dyspnoea (+), and muscular debility (++). The symptoms subsided within 15–60 min; in two pigeons, however, lethal anaphylaxis was observed (+++). Guinea pigs were sensibilized with fowl fibrinogen also; at first 0·1 ml were given subcutaneously, and 25 days later as reinjections of 0·25 ml intracardially.

Absorption tests. In these experiments the antiserum was mixed with an equal volume of fibrinogen solution (in controls with an equal volume of physiological sodium chloride solution or serum). Incubation was performed for one hour at room temperature with occasional shaking of the mixture. The precipitated sediment was centrifuged and the supernatant liquid was used to examine the presence of antibodies.

Results and Discussion

Results of principitin tests carried out with homologous and heterologous fibrinogens are summarized in Table I. *Mammalian fibrinogen antisera precipitate heterologous mammalian fibrinogens also but fail to precipitate fowl fibrinogen. On the other hand, fowl fibrinogen antiserum fails to precipitate any of the mammalian fibrinogens.*

In Table II results of anaphylaxis experiments are demonstrated. *In pigeons sensitized with any of the mammalian fibrinogens anaphylaxis was excited by all of the mammalian fibrinogens examined.* On the other hand no anaphylaxis was caused, when the pigeons were given fowl fibrinogen as "reinjection". We were unable to sensibilize pigeons with fowl fibrinogen. *In guinea pigs sensitized with fowl fibrinogen, anaphylaxis was excited by* reinjection of *fowl fibrinogen only,* and *not by any of the mammalian ones.*

Table II
Anaphylaxis reactions* of sensibilized pigeons with homologous and heterologous fibrinogens.

Reinjection	Sensibilisation: Fibrinogen					
	Beef	Swine	Horse	Sheep	Human	Fowl
Beef	+ + +	+	+	+	+ + +	–
Swine	+	+	+	+	+	–
Horse	+ +	+	+ +	+	+	–
Sheep	+	+	+	+	+	–
Human	+ +	+	+	+	+ +	–
Fowl	–	–	–	–	–	–
Fibrinogen						

* Explanation in the text.

The results of absorption experiments are shown in Table III.

The data of the Table clearly demonstrate that swine fibrinogen antiserum is absorbed by any of the other mammalian fibrinogens. The exhausted antiserum causes a precipitation of the homologous fibrinogen, but in a lower titre only. No absorption of the swine fibrinogen antiserum is attained by fowl fibrinogen, as examined with the homologous antiserum. Using the other antisera, identical results were obtained.

[1] P. R. MORRISON, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2723 (1947).
[2] J. E. GAHRINGER, J. Immunol. *12*, 477 (1926).

Table III

Absorption test with heterologous fibrinogens

Antibodies	Antigens				
	Beef	Swine	Horse	Sheep	Human
	Fibrinogen				
Swine fibrinogen antiserum + phys. NaCl*	1:125 +	1:250 +	1:125 +	1:125 +	1:125 +
Swine fibrinogen antiserum + Beef fibrinogen	–	1:32 +	–	–	–
Swine fibrinogen antiserum + Horse fibrinogen	–	1:64 +	–	–	–
Swine fibrinogen antiserum + Sheep fibrinogen	–	1:64 +	–	–	–
Swine fibrinogen antiserum + Human fibrinogen	–	1:64 +	–	–	–
Swine fibrinogen antiserum + Fowl fibrinogen	1:125 +	1:250 +	1:125 +	1:125 +	1:64 +
Swine fibrinogen antiserum + Swine serum	1:125 +	1:250 +	1:125 +	1:125 +	1:64 +

* The antiserum was mixed in each case with an equal part of phys. NaCl, or of fibrinogen solution, or of serum.

Our experiments demonstrate that a *very near relationship exists between the examined mammalian fibrinogens. Though all of them have some slight species specificity, there is a marked immunological boundary between mammalian and fowl* fibrinogen. Analytical studies concerning the polysaccharide content of various fibrinogens may indicate also the existence of such a difference[1] demonstrating *the presence of identical saccharides in mammalian fibrinogens and slight differences only in the ratio of hexose/glucosamin. The glucosamin level is considerably higher in fowl fibrinogen and fibrin.* Analytical data of this kind are of importance with regard to our problem too, since it is wellknown that in carbohydrate-protein complexes the carbohydrates play an important role in determining antigen properties.

Further investigations are in progress. Full details will be published elsewhere.

D. Bagdy and T. Szilágyi

Institute of Pharmaceutical Industrial Research, Budapest, and Institute of Pathophysiology, Medical University, Debrecen, December 1, 1952.

Zusammenfassung

Kaninchen wurden nach der Methode von Laki und Bagdy mit lyophilisierten Fibrinogenen vom Rind, Schwein, Pferd, Schaf, Geflügel und Mensch intravenös immunisiert. Die Säugetier-Fibrinogen-Immunsera *präzipitierten* nicht bloss das homologe Fibrinogen, sondern auch die übrigen Säugerfibrinogene; sie reagieren jedoch mit dem Geflügelfibrinogen nicht. Das Geflügelfibrinogen-Antiserum reagiert mit keinem Säugetierfibrinogen. Es wurde festgestellt, dass an mit Säugerfibrinogen sensibilisierten Tauben die Injektion eines anderen Säugerfibrinogens ebenfalls anaphylaktische Erscheinungen auszulösen imstande ist. Säugerfibrinogen-Antisera lassen sich durch das Fibrinogen eines anderen Säugetieres absättigen; das abgesättigte Immunserum bewirkt nur mehr eine Präzipitation des homologen Fibrinogens bis zu einem niedrigeren Titer. Durch Geflügelfibrinogen und homologes Serum lässt sich hingegen das Fibrinogen-Antiserum nicht absättigen. Die chemischen Analysen ergaben zwischen dem Kohlenhydratgehalt des Säuger- und Geflügelfibrinogens messbare Unterschiede.

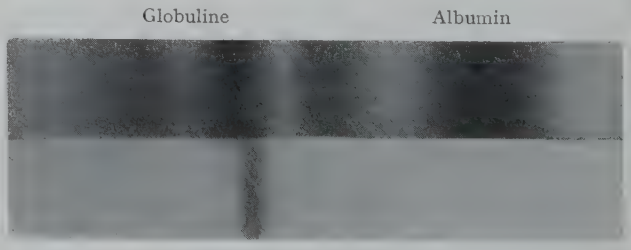
[1] I. Szára and D. Bagdy, Exper. (in press).

Über das Verhalten der Serumcholinesterase des Pferdes bei der Papierelektrophorese

Einleitung. Augustinsson[1] schreibt der Serumcholinesterase Albumincharakter zu. Klinische Beobachtungen von Faber[2] weisen auch in diese Richtung. Dazu im Widerspruch stehen die Resultate von Glick, Glaubach und Moore[3], die auf elektrophoretischen Untersuchungen basieren. Danach zeigt die Cholinesterase Beziehungen zur α- und vor allem zur β-Globulin-Unterfraktion.

Die vorliegende Mitteilung soll einen weiteren Beitrag zur Abklärung dieser Frage liefern.

Methoden. Um festzustellen, mit welcher Proteinfraktion sich die Serumcholinesterase im elektrischen Feld bewegt, wurde das Serum zuerst durch Elektrophorese auf Filtrierpapier in seine Fraktionen aufgetrennt, wobei wir uns im Prinzip an die Anordnung von Grassmann und Hannig[4] hielten. Darauf lokalisierten wir die Cholinesterase-Aktivität im Filtrierpapierstreifen durch Anwendung der histochemischen Methode von Koelle und Friedenwald[5].



Die Abbildung zeigt einen der Elektrophorese unterzogenen Filtrierpapierstreifen. Dabei wurde die obere

[1] K.-B. Augustinsson, Ark. Kemi Miner. Geol. [A] *18*, Nr. 24 (1944); Acta Physiol. Scand. *15*, Suppl. 52, 25 (1948).

[2] M. Faber, Acta Med. Scand. *114*, 72, 475 (1943).

[3] D. Glick, S. Glaubach und D. H. Moore, J. Biol. Chem. *144*, 525 (1942).

[4] W. Grassmann und K. Hannig, Naturwiss. *37*, 496 (1950); Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. *290*, 1 (1952).

[5] B. Koelle und J. S. Friedenwald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med *70*, 617 (1949).

Hälfte nach GRASSMANN und HANNIG behandelt. Sie lässt eine Auftrennung des Pferdeserums in die einzelnen Fraktionen erkennen. Mit der unteren Hälfte wurde der histochemische Nachweis nach KOELLE und FRIEDENWALD durchgeführt. Dadurch trat im Bereiche der β-Globulin-Unterfraktion ein dunkelbrauner Querstrich (in CuS umgewandeltes Cu-Thiocholin) auf. Bei Anwendung der beschriebenen Methoden resultiert somit eine direkte Beziehung zwischen Cholinesterase und β-Globulin-Unterfraktion, vorläufig ohne genauere Lokalisation.

Versuche über die Spezifität dieses Serumbestandteiles und zu seiner quantitativen Erfassung sowie Untersuchungen an anderen Tierseren sind vorgesehen.

G. P. TOGNI und O. MEIER

Veterinär-pharmakologisches Institut und Veterinärmedizinische Klinik der Universität Zürich, den 20. November 1952.

Summary

The paper-electrophoresis of horse-serum has shown, that the cholinesterase migrates with the β-globulin-fraction.

Action of Ouabain on ATP.-induced Contraction of Glycerol-extracted Muscle Fibers

According to KOREY[1] digitoxin (0·2 mg/ml) has no effect on the isotonic contraction of glycerinated muscle fibers from rabbit psoas, suspended in KREBS' solution. MALLOV and ROBB[2] reported in 1949 that 0·5 μg/ml of cardiac glycosides caused a more pronounced contraction of threads prepared from washed actomyosin from striated muscle. Similarly BOWEN[3] has observed that digoxin in the concentration of one μg/ml gives a more rapid contraction of threads prepared from myosin B.

The author has studied the effect of ouabain on the isotonic ATP.-contraction of glycerinated muscle fibers from rabbit psoas in the presence of various ions. Ouabain (10^{-5}—10^{-6} *M*) caused a more pronounced ATP.-contraction in the presence of 10^{-3} *M* calcium. 64 out of 71 experiments showed a positive effect. A preliminary presentation of the results has been given at the meeting of the Scandinavian Pharmacological Society in Uppsala August 1952.

A more detailed report will appear later.

K. A. P. EDMAN

Pharmacological Institute, University of Uppsala, December 18, 1952.

Zusammenfassung

In Gegenwart von 10^{-3} *M* Kalzium beschleunigt und verstärkt Ouabain (10^{-5}—10^{-6} *M*) die ATP-Kontraktion der glyzerinextrahierten Muskelfaser.

[1] S. KOREY, Biochim. biophys. Acta *4*, 58 (1950).
[2] S. MALLOV and J. S. ROBB, Fed. Proc. *8*, 104 (1949).
[3] W. J. BOWEN, Fed. Proc. *11*, 16 (1952).

Zur Pharmakologie des Reserpin, eines neuen Alkaloids aus *Rauwolfia Serpentina* Benth.

(2. Mitteilung über Reserpin)[1]

Kürzlich wurde in dieser Zeitschrift über ein, in unseren Laboratorien isoliertes, neues Alkaloid aus *Rauwolfia Serpentina* Benth, das *Reserpin*, berichtet (MÜLLER, SCHLITTLER und BEIN[2]). Im folgenden sollen einige charakteristische pharmakologische Eigenschaften des Reserpin beschrieben werden.

1. *Sedative Wirkung.* In indischen Arbeiten wurden Rauwolfia-Extrakten experimentell eine wechselnd stark ausgeprägte sedative und eine inkonstante blutdrucksenkende Wirkung zugeschrieben (siehe dazu [2]). Beide Wirkungskomponenten kommen konstant dem Reserpin zu, wobei bei Hund, Katze und Kaninchen eine starke zentralsedative Wirkung im Vordergrund steht. An der Maus ist ein sedativer Effekt erst mit wesentlich höheren Dosen zu erzielen.

Nach kleinen Dosen Reserpin sind die Tiere müde und benommen, während sie nach grösseren ruhig schlafen. Es ist charakteristisch, dass sie auch durch relativ sehr hohe Dosen von Reserpin nicht in eine eigentliche Narkose versetzt werden. Sie können vielmehr jeweils durch äussere, akustische oder taktile Reize wieder für kurze Zeit aufgeweckt werden, um dann allmählich wieder in Schlaf zu fallen. Die Corneal- und die Kneifreflexe sind nicht abgeschwächt; dem Reserpin fehlt somit eine analgetische Wirkung.

Die Pupillenreaktion auf Lichteinfall bleibt erhalten, wenn auch als erstes und am längsten dauerndes Symptom eine ausgesprochene *Miosis* gelten darf, die beim Hund bereits nach der peroralen Gabe von nur 0,01 mg/kg deutlich erkannt werden kann.

Die für einen sedativen Effekt notwendigen Dosen sind besonders beim Hund sehr gering, und die Wirkung dauert lange an; bereits 0,03 mg/kg, peroral verabreicht, können genügen, um während Stunden einen ruhigen Schlaf und über etwa 2 Tage vermehrtes Schlafbedürfnis und starke Müdigkeit hervorzurufen.

Auch beim Kaninchen sind kleine Dosen lang wirksam; die Wirkungsdauer erreicht nach 0,1 mg/kg i.v. – das heisst rund der 1/100 der akuten intravenösen Letaldosis – etwa 2 Tage und nach Dosen von 1–5 mg/kg i.v. sogar 6–7 Tage.

Dies könnte möglicherweise mit physikalisch-chemischen Eigenschaften des sehr schwer löslichen Reserpin in Zusammenhang stehen, könnte auch dadurch erklärt werden, dass vielleicht Umwandlungs- bzw. Abbauprodukte des Reserpin wirksam sind, besonders auch, da der Wirkungseintritt erst nach einer Latenzzeit erfolgt. Diese ist nach kleineren Dosen länger als nach grösseren Dosen und beträgt auch nach intravenöser Injektion im Durchschnitt etwa eine halbe Stunde. Das Optimum der Wirkung wird auch nach parenteraler Applikation oft erst nach drei und mehr Stunden erreicht.

Bei der Maus entwickelt sich oft nach Reserpin ein – allerdings meist nur sehr mässig ausgeprägtes – Straubsches Schwanzphänomen, das als Zeichen einer zentralen Wirkung gelten darf.

[1] J. M. MÜLLER, E. SCHLITTLER und H. J. BEIN, Exper. *8*, 338 (1952).
[2] N. K. CHAKRAVARTY, M. N. R. CHAUDHURI und R. N. CHAUDHURI, Ind. med. Gazette 348 (1951). – R. N. CHOPRA, J. C. GUPTA, B. C. BOSE und I. C. CHOPRA, Ind. J. med. Res. *31*, 71 (1943) – R. N. CHOPRA, J. C. GUPTA und S. N. MUKERJEE, Ind. J. med. Res. *21*, 261 (1933). – J. C. GUPTA, B. S. KAHALI, A. DUTT, Ind. J. med. Res. *32*, 183 (1944). – J. C. GUPTA, A. K. DEB und B. S. KAHALI, Ind. med. Gazette 547 (1943). – R. J. VAKIL, Brit. Heart J. *11*, 350 (1949).

2. *Kreislaufwirkung bei der Katze.* Reserpin senkt bei der mit Dial-Urethan oder mit Chloralose narkotisierten Katze den arteriellen Blutdruck über Stunden (Abb. 1). Ähnlich wie bei der sedativen Wirkung erfolgt der Wirkungseintritt allmählich und das Maximum des Blutdruckabfalls wird erst nach einiger Zeit erreicht. Für Reserpin ist charakteristisch, dass der drucksenkende Effekt nicht über ein bestimmtes Ausmass gesteigert werden kann, und zwar auch dann nicht, wenn die Dosis beträchtlich erhöht wird.

Beim Spinaltier mit niedrigem Druck wird keine Blutdruckwirkung des Reserpin mehr beobachtet. Wird der Blutdruck der Spinalkatze durch Ephedrin wiederum erhöht, so wirkt Reserpin nicht mehr drucksenkend.

Akut lässt sich in der Mehrzahl der Versuche bei der Katze keine signifikante Beeinflussung der Herzfrequenz erkennen; in einzelnen Versuchen zeigte sich eine Bradykardie und ausnahmsweise eine geringe Tachykardie. In klinischen Versuchen und nach persönlicher Mitteilung von Yonkman *et al.* kommt es beim Hund unter Reserpin meist zu einer ausgesprochenen Bradykardie.

Bei dieser ausgeprägten drucksenkenden Wirkung steht naturgemäss die Frage nach dem Wirkungstypus und nach dem Wirkungsmechanismus im Vordergrund. Wenn auch die bisherigen Untersuchungen noch keine endgültige Stellungnahme zu beiden Fragen gestatten, so geben sie doch Anhaltspunkte, die eine nähere Präzisierung des Wirkungsmechanismus in einzelnen Richtungen erlauben. Die bisher vorliegenden Befunde über den Wirkungstypus lassen noch offen, ob die drucksenkende Wirkung im wesentlichen durch eine periphere Gefässerweiterung, durch eine Verkleinerung der zirkulierenden Blutmenge oder durch eine Verminderung der Herzleistung oder eine Kombination dieser Faktoren zustande kommt. In dieser Mitteilung soll vor allem versucht werden abzuklären, ob die Blutdrucksenkung zentral ausgelöst und somit neben der sedativen Wirkung als weiteres Zeichen für die hohe Affinität des Reserpin zum Zentralnervensystem gedeutet werden darf, oder ob dafür in erster Linie peripher angreifende Faktoren massgebend sind. Zur Bestimmung einer möglichen peripheren Wirkung wurde deshalb versucht zu entscheiden, ob dem Reserpin eine direkte gefässerweiternde Wirkung auf die Gefässe zukommt, ob es den peripheren Sympathicusanteil – sei es durch eine peripher sympathicolytische, sei es durch eine ganglionär blockierende Wirkung – hemmt, oder ob möglicherweise eine direkte Erregung des vagalen Systems im Vordergrund steht.

Im Gegensatz zu vasoaktiven Stoffen lässt sich in Versuchen mit der Reinschen Thermostromuhr nach Reserpin keine unmittelbare peripher vasodilatorische Wirkung bei Messen des Stromvolumens an der a. femoralis erkennen.

Blutdrucksteigerungen, hervorgerufen durch Adrenalin bzw. Nor-Adrenalin, die bekannten Wirkstoffe des sympathischen Systems, werden nicht gehemmt, sondern signifikant verstärkt (Abb. 1–4). Eine eigentliche peripher sympathicolytische Wirkung dürfte somit auszuschliessen sein.

Die synaptische Übertragung im Gangl. cervic. sup. der Katze mit der Nickhaut als Erfolgsorgan – ein geeignetes Testobjekt für das Prüfen von ganglionär-blokkierenden Stoffen – wird durch Reserpin auch in der relativ hohen Dosis von 2 mg/kg i.v. während einer Beobachtungsdauer von rund 3 Std. nicht signifikant beeinflusst[1].

[1] Um möglichst konstante Reizeffekte zu erzielen, verwendeten wir eine spezielle Flüssigkeitselektrode, ähnlich der von D. A. Ross, Rev. canad. Biol. *6*, 544 (1947), beschriebenen.

Im weiteren Gegensatz zu typischen ganglionärblockierenden Stoffen, zum Beispiel dem Pendiomid, wird auch die Ausschüttung von Pressorstoffen aus der Nebenniere nicht gehemmt, sondern die Blutdrucksteigerung nach elektrischer Reizung des efferenten Splanchnikus wird in ähnlicher Weise verstärkt wie die nach i.v. injiziertem Adrenalin bzw. Nor-Adrenalin (Abb. 2).

Eine Erregung des vagalen Systems als Ursache des Blutdruckabfalls erscheint wenig wahrscheinlich, da dieser durch Atropin, auch mit der hohen Dosis von 1 mg/kg i.v., nicht beeinflusst wird. Die Acetylcholin-Blutdruckwirkung wird durch Reserpin nicht verstärkt.

Der durch Reserpin bedingte Druckabfall wird durch doppelseitiges Ausschalten von Vagus und Depressor (Durchschneiden bzw. Kühlen der Nerven) nicht vermindert und die Wirkung von i.v. injiziertem Veratrin nicht verstärkt. Eine Erregung bestimmter peripherer Rezeptorenfelder analog der Veratrinwirkung dürfte somit als Ursache für die Blutdrucksenkung durch Reserpin kaum in Frage kommen.

Die Blutdrucksenkung bei der Katze scheint deshalb durch eine direkte Beeinflussung blutdruckregulierender Zentren ausgelöst, eine Annahme, die auch durch folgende Beobachtungen gestützt erscheint:

Reserpin unterdrückt bereits mit kleinen Dosen Blutdrucksteigerungen, die durch elektrische Reizung des afferenten Vagus, des afferenten Ischiadicus und durch Erniedrigung des Druckes im Carotis-Sinus verursacht sind (Abb. 3, 4 und 5).

Dies erscheint besonders deshalb von Interesse, da Reserpin keine peripher sympathicolytischen und ganglienblockierenden Eigenschaften besitzt. Bei der Katze unterdrückt Pendiomid derartige Blutdrucksteigerungen[1], und dem Regitin als typischem Sympathicolyticum kommt ebenfalls eine hemmende Wirkung zu. Diese Blutdrucksteigerungen nach afferenter Nervenreizung dürften deshalb durch das sympathische System, zumindest durch das periphere efferente Neuron, vermittelt werden. Die Hemmung solcher zentral vermittelter, reflektorischer Blutdrucksteigerungen ist somit nach den bisherigen Befunden eine typische Wirkungskomponente des Reserpin. Ob es sich dabei um eine Blockierung der synaptischen Übertragung im zentralen Anteil des autonomen Systems zwischen afferentem und efferentem Neuron, um eine Empfindlichkeitsverminderung zentraler sympathischer Anteile oder um eine antagonistische Wirkung gegenüber bisher noch hypothetischen Pressorstoffen, die nach Page *et al.*[2] bei solchen Blutdrucksteigerungen frei werden sollen, handelt, kann zur Zeit noch nicht übersehen werden. Mit einer Blockierung von zentralen sympathischen Substraten dürfte eine durch Reserpin bedingte Erschlaffung der Nickhaut bei Hund und Katze in Zusammenhang stehen, da die peripheren Neuronen durch das Reserpin, wie vorher ausgeführt, nicht blockiert werden.

3. *Weitere Wirkungen.* Bei der pharmakologischen Prüfung des Reserpin ergaben sich als weitere Zeichen für einen zentralen Angriffspunkt: Eine Beeinflussung des Wärmeregulationszentrums, da Kaninchen nach Gabe des Präparates in höherer Umgebungstemperatur eine Temperatursteigerung zeigen; in der Mehrzahl der Versuche wird die Körpertemperatur (gemessen im Rektum) gesenkt. Eine eigentliche antipyretische Wirkung (nach Fiebererzeugung mit Colibazillen) liess sich

[1] H. J. Bein und R. Meier, Schweiz. med. Wschr. *81*, 446 (1951).

[2] R. D. Taylor, J. H. Page und A. C. Corcoran, Arch. int. Med. *88*, 1 (1951). Siehe dazu auch V. Erspamer, Arch. Int. Med. *90*, 505 (1952).

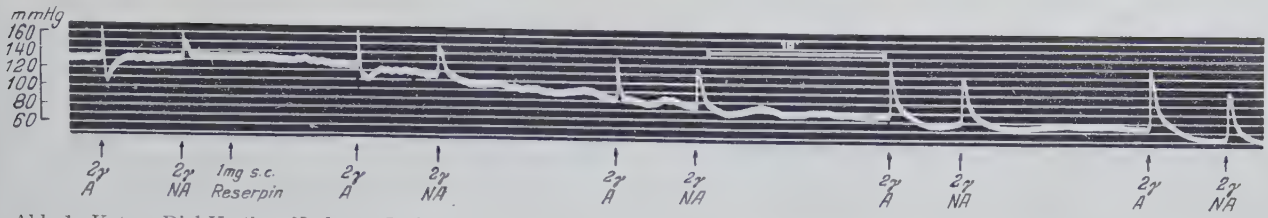


Abb. 1. Katze, Dial-Urethan-Narkose. Senkung des arteriellen Druckes durch 1 mg/kg s.c. Reserpin und Verstärkung der Blutdruckwirkung von 2 γ/kg i.v. Adrenalin (A) und 2 γ/kg i.v. Nor-Adrenalin (NA).

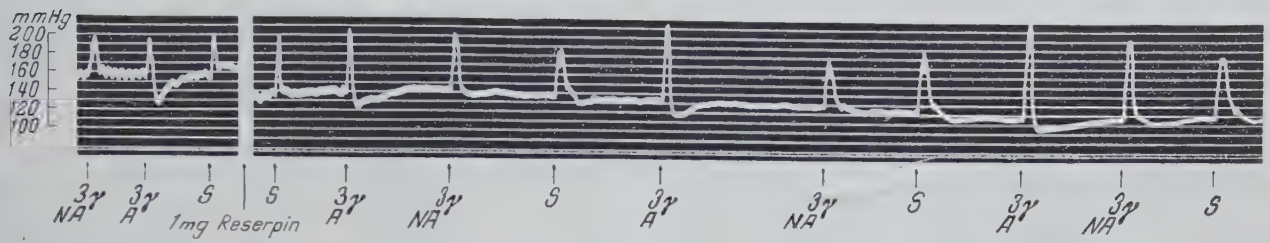


Abb. 2. Katze, Dial-Urethan-Narkose, Arterieller Druck. Reserpin 1 mg/kg i.v. verstärkt die Pressorwirkung nach einer elektrischen Reizung des efferenten Splanchnikus (*S*), von Adrenalin (*A*) 3 γ/kg i.v. und Nor-Adrenalin (NA) 3 γ/kg i.v.

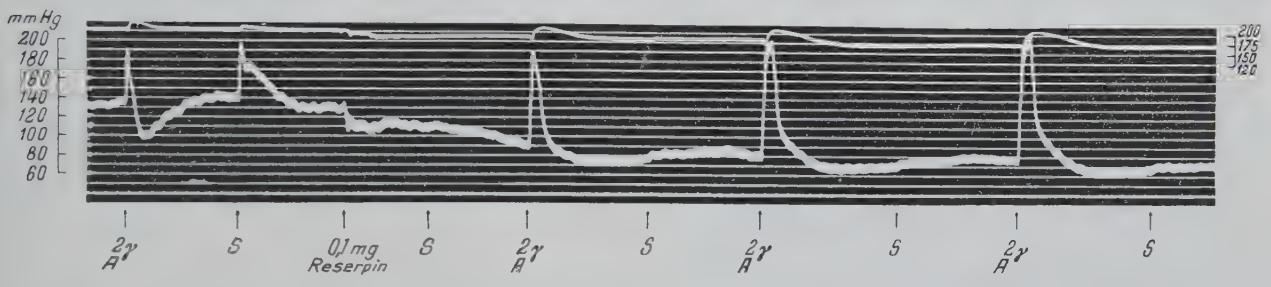


Abb. 3. Katze, adrenalektomiert, Dial-Urethan-Narkose. Arterieller Druck, Pulsfrequenzschreibung nach Gross und Häfelfinger[1] (oberste Kurve, Eichung: Skala am rechten Bildrand). Blutdrucksteigerungen nach elektrischer *afferenter Ischiadikusreizung* (*S*) werden durch Reserpin 0,1 mg/kg i.v. unterdrückt, die Pressorwirkung von 2 γ/kg i.v. Adrenalin (A) wird verstärkt. Die Herzschlagfrequenz nimmt unter Reserpin von rund 200 auf etwa 175/min ab; die Adrenalintachykardie wird wie eine kurzdauernde primäre Adrenalin-Bradykardie verstärkt.

[1] F. Gross und Ch. Häfelfinger, Helv. physiol. Acta *9*, C_6 (1951).

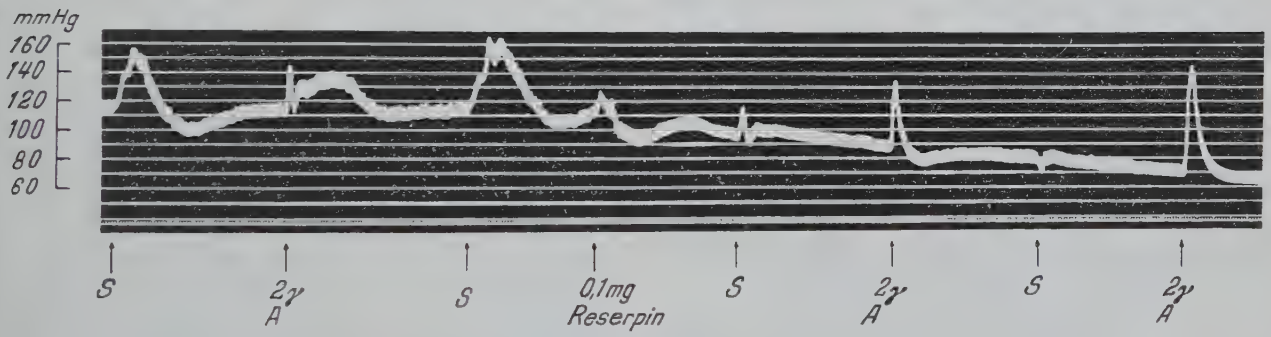


Abb. 4. Katze. Dial-Urethan-Narkose. Arterieller Druck. Hemmung der Blutdrucksteigerungen nach elektrischer *afferenter Hals-Vagus-Reizung* (*S*) durch 0,1 mg/kg i.v. Reserpin. *A*: i.v. Injektion von 2 γ/kg Adrenalin.

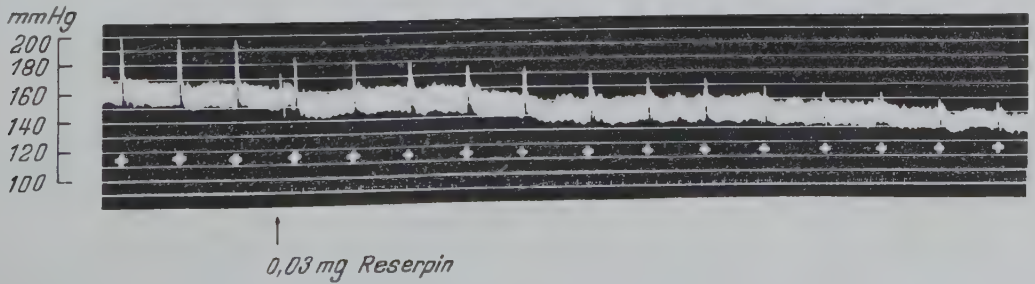


Abb. 5. Katze. Dial-Urethan-Narkose. Vagus und Depressor beidseitig durchschnitten. 0,03 mg/kg i.v. Reserpin unterdrücken den Carotis-Sinus-Okklusionsreflex. (Beim + Abklemmen der A. carotis comm. während 15 s.)

beim Kaninchen dagegen bis zu einer Dosis von 1 mg/kg i.v. nicht nachweisen.

Die Atmung wird durch Reserpin in der Mehrzahl der Versuche etwas vertieft, die Frequenz nicht oder nur unwesentlich gesteigert. Nach hohen Dosen kann die Atmung deutlich gehemmt werden. Die Verabreichung von akut letal wirkenden Dosen verursacht einen zentral bedingten Atemstillstand.

Die neuromuskuläre Übertragung (Gastrocnemius-Präparat, Katze *in situ*) wird nicht gehemmt.

Die Darmtätigkeit wird nach peroraler oder intravenöser Gabe von Reserpin angeregt, was auch von Rauwolfia-Totalextrakten beim Menschen beschrieben wurde[1]; Defäkation, bzw. nach höhern Dosen Durchfall, ist ein fast regelmässig anzutreffendes Symptom nach Verabreichung von Reserpin. Die Wirkung des Acetylcholin am Dünndarm und am Dickdarm *in situ* wird beim Kaninchen und bei der Katze durch Reserpin nicht verstärkt.

H. J Bein

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, den 15. Januar 1953.

Summary

Reserpin, a new, highly active alcaloid from *Rauwolfia serpentina* benth., shows a very marked hypnotic effect and lowers the blood pressure.

Reserpin inhibits pressor responses evoked by electrical stimulation of the afferent vagus and sciatic nerves, and inhibits the pressor reflex of the carotid sinus. It does not inhibit pressor responses evoked by electrical stimulation of the splanchnic nerves.

Reserpin has no peripheral sympathicolytic and no ganglionic blocking activity; the action of sympathicomimetic substances, e.g. adrenaline, nor-adrenaline, ephedrine, is enhanced. It does not potentiate the acetylcholine effect. The blood pressure effect is not inhibited by atropine and by cutting the vagi and depressor nerves.

Reserpin stimulates peristalsis. The neuro-muscular transmission is not impaired.

There is evidence, that central portions of the sympathetic system are inhibited by *Reserpin*.

[1] Zum Beispiel J. C. Gupta, A. K. Deb und B. S. Kahali, Ind. med. Gazette *73*, 547 (1943).

Über die Möglichkeit des Vorkommens doppelgipfliger Häufigkeitsverteilungen bei homogenem Material

Bei der Auswertung einer pharmakologischen Untersuchung (Azetylcholinkontraktionen des Musculus rectus abdominis des Frosches) erhielten wir zweigipflige Häufigkeitsverteilungen. Der Annahme, dem Versuch liege ein inhomogenes Material zugrunde, konnten wir uns nicht unbedingt anschliessen, wir versuchten vielmehr, durch folgende experimentelle Anordnung eine andere Deutungsmöglichkeit für das Auftreten dieser Verteilungskurve zu geben: Versuch 1. Mit einer 1-cm³-Pipette wurde 0,225 cm³ (!) 1 *n* HNO_3 zu 5,0 cm³ 1/20 *n* NaOH, der als Indikator Neutralrot zugesetzt war, pipettiert und die Farbintensität photometrisch gemessen. Gerade diese Menge Salpetersäure war notwendig, um im Mittel bei Zusatz zur Natronlauge den pH-Wert von 7,3, den Umschlagspunkt des Indikators, zu ergeben, wie die vorher aufgestellte «Dosis-Wirkungs-Kurve» ergab. Versuch 2. Mit derselben Pipette wurde wiederum dieselbe Menge 1 *n* HNO_3 pipettiert und auf der analytischen Waage gewogen. – Da die methodischen Streuungen des Photometers und der Waage in einer Grössenordnung liegen und klein sind im Vergleich zur Streuung des Pipettierens, ist die Gesamtstreuung der Versuche 1 und 2 etwa gleich gross und nur vom Pipettierfehler abhängig.

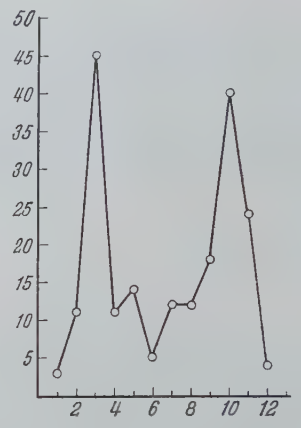


Abb. 1. Häufigkeitsverteilung von 199 Photometerwerten entsprechend Versuch Nr. 1. Ordinate: Absolute Häufigkeit. Abszisse: Klassenmittelpunkte; die Klassenbreite beträgt 1/12 der zwischen den beiden gemessenen Extremwerten liegenden Strecke.

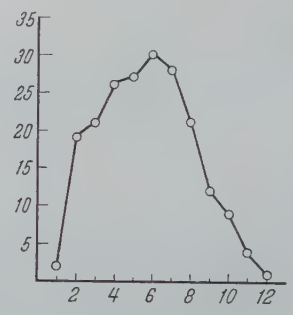


Abb. 2. Häufigkeitsverteilung von 200 Wägungen entsprechend Versuch Nr. 2. Ordinate: Absolute Häufigkeit. Abszisse: Klassenmittelpunkte; die Klassenbreite beträgt 1/12 der zwischen den beiden Extremwerten liegenden Strecke.

Werden nun die Häufigkeitsverteilungen der Ergebnisse aus den beiden Versuchen aufgezeichnet, so ergibt sich für den 1. Versuch eine symmetrische Doppelgipfligkeit (Abb. 1) und für den 2. Versuch die Gausssche Glockenkurve (Abb. 2). Der Unterschied in der Form der Häufigkeitsverteilungen ist unseres Erachtens auf die Art der Funktion, die der «Dosis-Wirkungs-Kurve» zugrunde liegt, zurückzuführen. Während das Gewicht eine lineare Abhängigkeit vom Volumen aufweist, stellt die Indikatorfarbe eine Funktion des Volumens dar, die dem biologischen «Alles-oder-Nichts-Gesetz» nahe kommt. Immer dann, wenn eine Funktion letzterer Art vorliegt und die Streuung der Versuchsanordnung im Vergleich zur Projektion des steilen Kurvenabschnittes auf die Abszisse gross ist (bei Wahl eines numerischen Koordinatensystems), muss bei statistisch häufiger Gabe der ED_{50} eine symmetrisch doppelgipflige Häufigkeitsverteilung entstehen. Da im Biologischen mit dem Auftreten dieser Bedingungen (Dosis-Wirkungs-Kurve vom «Alles-oder-Nichts-Gesetz»-Typ,

grosse Streuung) gerechnet werden muss, erscheint es uns bedenklich, jede doppelgipflige Häufigkeitsverteilung durch ein inhomogenes Material deuten zu wollen. (Ausführliche Darstellung erfolgt an anderer Stelle.)

H. Lüllmann und W. Förster

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Dezember 1952.

Summary

Our experiments suggest that a M-shaped curve of frequency distribution does not need to be always the result of non-homogeneous materali.

New Investigations on the Pyramidal System in *Macaca mulatta*

Repetitive electrical square wave shocks of short duration (0·5–1 ms) were used for stimulation of the precentral cortical area in monkeys (*Macaca mulatta*). The action potentials were led off from peripheral nerves in the fore limbs (N. ulnaris, N. medianus, N. radialis) and the hind limbs (N. tibialis, N. peroneus, the hamstring nerve) and from the ventral roots in the lumbar region. In some experiments the action potentials of the pyramidal fibres in the lateral columns in the lumbar part of the cord were also recorded. The animals were narcotized with dial and had received a small dose of d-tubocurarine (0·7 mg per kg).

1. *Monosynaptic activation of spinal motoneurones from the precentral region*

When a stimulus frequency of 15 per second was used (bipolar stimulation and low stimulus strength) for stimulation of the precentral region (area 4) the electrical response in the peripheral nerves or the ventral roots on the *contralateral* side which followed upon each stimulus consisted of an early synchronized action potential and subsequent less synchronized potential waves. Figure 1 *A* shows a series of superimposed records of the initial part of the action potentials in the right L_5 ventral root when the upper part of the left precentral region was stimulated. The latency of the first action potential was on an average 4·7 ms (stimulus artefact to the left in the picture). The latency of the initial discharge in the lateral pyramidal tract recorded at the level of L_5 and evoked by stimulation of the same cortical point was 3·6 ms (Fig. 1 *B*). When taking into account the conduction length from the cortex to the L_5 segment this latency shows that the conduction velocity for the most rapidly conducting fibres of the corticospinal fibres is about 60 M per second. If this latency value (3·6) and the value of the conduction time in the ventral root (0·4 ms; see Fig. 1 *C*) are substracted from 4·7 one obtains 0·7 ms. This value is of the same magnitude as the synaptic delay in the oculomotor nucleus[1] and that of the monosynaptic spinal reflex relay[2].

Thus, our experiments show that in *Macaca mulatta* a monosynaptic relay is involved between the most rapidly conducting pyramidal fibres and the spinal motoneurones. Monosynaptic activation of the motoneurones from corticospinal neurones has never been shown before, the reason being that earlier investigations of similar type were performed on cats[1].

The thorough analysis by Lloyd[1] on cats showed that in the lumbar region of this animal spinal interneurones are of great importance for activation of the motoneurones when descending fibres in the pyramids are stimulated. Monosynaptic activation was never found. In experiments on cats we confirmed Lloyd's observations and we found that pyramidal activation of the motoneurones in the cervical region of the same animal were also of internuncial order. Our experiments on cats also indicated: (i) that the majority of fibres in the pyramids are not of precentral cortical origin; (ii) that the lateral pyramidal tract to the lumbar region is poorly developed in this animal (*cf.* Lassek[2]); and (iii) that the ventral pyramidal tract is absent (cf. Winkler and Potter[3]).

It is of great interest that monosynaptic activation of the spinal motoneurones from corticospinal fibres can be shown in the monkey, which has a more developed pyramidal system than the cat, including both a ventral and a lateral pyramidal tract.

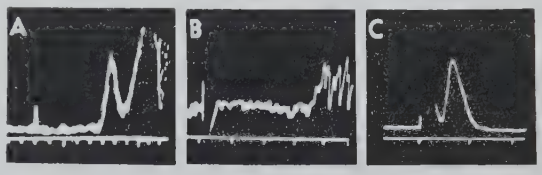


Fig. 1.—*A*, superimposed records of the initial part of the action potentials in the right L_5 ventral root following each stimulus in a train of shocks delivered to the upper part of the left precentral cortical area (stimulus frequency 15 per second). *B*, action potentials from the right lateral pyramidal tract at the L_5 level following stimulation of the same cortical point as in *A*. *C*, action potential in the L_5 ventral root (electrodes on the peripheral end of the cut root) following stimulation at the root entry. Time in milliseconds.

We found that the monosynaptic response was most easily obtained when stimulus frequencies between 10 and 20 per second were used, although we have obtained it in the cervical region also when single shocks were used. In localization experiments, the lowest threshold for monosynaptic responses in the L_5 root and in the nerves of the hind limb was found in the upper part of the precentral gyrus corresponding to the hind leg area. The lowest threshold for monosynaptic responses in the nerves of the fore limb was obtained lateral to the hind leg area. Stimulation of the postcentral and frontal areas with stimulus strengths at threshold for response in the nerves of the legs evoked from the precentral area did not elicit any monosynaptic response.

When the lateral column (including the lateral pyramidal fibres) was cut contralaterally to the precentral region stimulated, the total response in the contralateral ventral roots diminished, whereas a large monosynaptic response appeared in the *ipsilateral* ventral roots (release). This response diminished when the lateral column on the ipsilateral side was transected. The first part of the experiment shows that in monkeys there are monosynaptic connections between the pyramidal neurones and the motoneurones also on the ipsilateral side. The second part indicates that part of the pyramidal fibres which connect the precentral cortical region and

[1] R. Lorente de Nó, Amer. J Physiol. *111*, 272 (1935); *112*, 595 (1935); *113*, 505 (1935).

[2] J. C. Eccles and J. J. Pritchard, J. Physiol. *89*, 43 (1937). – B. Renshaw, J. Neurophysiol. *3*, 373 (1940). – D. P. C. Lloyd, J. Neurophysiol. *6*, 110 (1943).

[1] D. P. C. Lloyd, J. Neurophysiol. *4*, 525 (1941).

[2] A. M. Lassek, J. Neuropath. *5*, 72 (1946).

[3] C. Winkler and A. Potter, *An anatomical guide to experimental researches on the cats brain*, Amsterdam (1914).

the motoneurones on the same side, run in the lateral pyramidal tract. The last conclusion is in agreement with histological observations on the chimpanzee[1].

2. The rôle of the anterior columns for the activation of spinal motoneurones

When the anterior columns (including the ventral pyramidal tract) were transected in the cervical region, the ventral root responses elicited from the precentral cortex diminished and even disappeared, although the lateral columns were left intact. These experiments show the paramount importance of the anterior columns (including the anterior pyramidal tracts) for activation of the motoneurones from the precentral cortex in animals with well developed pyramidal system. The importance of the ventral columns for the activation of the spinal motoneurones was also demonstrated by chronic experiments which showed that transection of the anterior columns (at Th^{9-10}) was followed by a considerable impairment of the motility in the hind legs. Further, stimulation of the precentral area in such an animal was followed by a very poor electrical response in the nerves of the hind legs.

3. Some clinical aspects

On the basis of the observations summarized in paragraph 2 concerning the importance of the anterior columns, it is possible to explain why in many cases paresis follows upon cordotomies on patients with intractable pains[2]. The results are also of interest for the explanation of the motor defects following compression of the *anterior* part of the spinal cord in patients having invertebral disc herniations[2]. The fact that transection of the lateral columns in man only slightly affects the voluntary movements[3] demonstrates the importance of the ventral columns in man.

C. G. Bernhard, E. Bohm, and I. Petersén

Physiological Department II, Karolinska Institutet, Stockholm, October 24, 1952.

Zusammenfassung

Es wurde in elektrophysiologischen Versuchen gezeigt, dass bei dem Affen (*Macaca mulatta*) die spinalen Motoneuronen von den kortikospinalen Neuronen monosynaptisch aktiviert werden können. Einige Eigenschaften der monosynaptischen Aktivität wurden beschrieben und einige klinische Aspekte aufgezeigt.

[1] J. F. Fulton and D. Sheehan, J. Anat. *69*, 181 (1935).
[2] C. G. Bernhard, E. Bohm, and I. Petersén (in press).
[3] T. J. Putnamn, Arch. Neurol. Psychiat. *44*, 950 (1940). – L. C. Oliver, Lancet *256*, 910 (1949). – O. Sjöqvist (personal communication)

DISPUTANDUM

Über das Wesen der optomotorischen Reaktionen

In einem kürzlich in dieser Zeitschrift erschienenen Aufsatz berichten W. v. Buddenbrock und I. Moller-Racke über Versuche zur Frage, inwieweit die retinalen Bildverschiebungen, die bei der Eigenbewegung der Insekten entstehen, optomotorisch wirksam sind[1]. Zu dieser das Wesen der Optomotorik berührenden und sinnesphysiologisch ganz allgemein bedeutsamen Frage möchten wir folgendes bemerken.

Schwimmende und fliegende Tiere sind ständig der Gefahr passiver Vertragung durch Strömung oder Wind ausgesetzt. An sich, ohne Kontakt mit dem Untergrund, wären diese Vertragungen nach Richtung und Ausmass für die Tiere nicht wahrnehmbar. Viele haben aber ein Interesse an der Beibehaltung eines bestimmten Aufenthaltsortes in bezug auf die feste Umgebung. So ist es begreiflich, dass sie sich gegen die passive Vertragung durch aktive Kompensationsbewegungen schützen und sich dabei nach der scheinbar verschiebenden Umgebung orientieren. Sofern diese Kompensationsbewegungen optisch ausgelöst werden, entsprechen sie den «optomotorischen Reaktionen» des Laboratoriumsversuches.

Im letzteren Fall pflegt man die natürlichen Verhältnisse gewissermassen umzukehren, indem man eine künstlich gegliederte «Umgebung» (senkrecht gestreiftes Papierband) am gläsernen Tierbehälter vorbeigleiten lässt. Bewegt man das Band geradlinig, so ist gegen diese Umkehrung nicht viel einzuwenden. Etwas anders liegt der Fall jedoch bei der üblichen Verwendung einer kreisförmigen «Umgebung» relativ geringen Durchmessers. Die hier gebotene Situation entspricht – auch nach Umkehrung – weit weniger natürlichen Verhältnissen[2]. Auch ist die Beteiligung etwa vorhandener Drehsinnesorgane zu berücksichtigen, das heisst, es ist nicht immer gleichgültig, ob man die Umgebung um das Tier herum dreht oder umgekehrt das Tier innerhalb der ruhenden Umgebung. Der Versuch führt ferner leicht zu Trugschlüssen, wie wir sehen werden.

Nach unserer oben erwähnten Auffassung liegt die biologische Bedeutung der optomotorischen Reaktionen im wesentlichen in der Kompensation passiver Vertragung[3]. Damit wäre aber ihr Auftreten infolge aktiver Eigenbewegung des Tieres unverständlich. Zweifellos kann die Bildverschiebung auf der Retina die gleiche sein, ob sich nun das Tier passiv oder aktiv in bezug auf die Umgebung bewegt. Entscheidend für das Auftreten oder Ausbleiben motorischer Reaktionen ist jedoch das Gehirn, welches *mit der aktiven Bewegung auch die ihr inhärente Bildverschiebung selbst hervorruft* und darüber also *a priori* informiert sein kann. Wüsste ein Tier ganz allgemein nicht haargenau zwischen der Reizung seiner Sinnesorgane infolge passiver und aktiver Bewegung zu unterscheiden, so wäre es nicht nur gegen passive Vertragung mangelhaft geschützt, sondern überhaupt ständig Täuschungen ausgesetzt.

Für die allgemeine Verbreitung dieser sinnesphysiologisch fundamental wichtigen Unterscheidungsfähigkeit sprechen denn auch zahlreiche Tatsachen, sowohl aus der menschlichen Wahrnehmungslehre als aus dem Verhalten der Tiere. So konnten wir feststellen, dass man Elritzen auf Darbietung geringfügiger Änderungen des hydrostatischen Druckes dressieren kann, und führten aus: «Es mag erstaunlich scheinen, dass auch eine lebhaft im Versuchsgefäss auf- und abschwimmende Elritze eine Druckschwankung um 1 cm prompt bemerkt, ob-

[1] W. v. Buddenbrock und Ingrid Moller-Racke, Exper. *8*, 392 (1952).
[2] S. Dijkgraaf, Z. vgl. Physiol. *20*, 162 (1934).
[3] Der sogenannte Eisenbahnnystagmus bzw. ähnliche Erscheinungen bei Tieren treten auf, wenn der verschiebenden Umgebung nur mit den Augen gefolgt wird. Das Ausbleiben entsprechender Lokomotorik kann verschiedene Gründe haben, zum Beispiel mechanischer Kontakt mit dem Untergrund. Die Beibehaltung des Gesichtsfeldes kann die optische Wahrnehmung unterstützen und auch in diesem Sinne biologisch bedeutsam sein.

wohl sich für sie der hydrostatische Druck von selbst fortwährend um mehrere (bis 20) Zentimeter ändert. Es liegt hier ein ähnlicher Fall vor wie bei der Reizung der Seitenorgane: jede, auch die geringste von einem Fremdkörper hervorgerufene Wasserbewegung wird wahrgenommen, obwohl die Seitenlinien gleichzeitig von den mannigfaltigsten, durch die Schwimmbewegungen des Fisches erzeugten Wasserbewegungen getroffen werden. Der Unterschied liegt eben in beiden Fällen darin, dass der eine Reiz von einer fremden Gewalt, der andere dagegen vom Fisch selbst hervorgerufen wird. An die Reize der letzteren Art ist er durch ihr unaufhörliches Auftreten wahrscheinlich so gewöhnt, dass er sie kaum oder gar nicht bemerkt[1].» Ausser durch Erfahrung oder Gewöhnung könnten die infolge der Eigenbewegung zu erwartenden Sinnesreize den Tieren auch angeborenermassen gegeben sein. v. Holst und Mittelstaedt haben die Gesamtheit dieser selbsterzeugten Sinnesreize neuerdings als «Reafferenz» der durch äussere Ursachen bewirkten «Exafferenz» gegenübergestellt und im sogenannten Reafferenzprinzip den Versuch einer physiologischen Deutung des beobachteten Tatbestandes gemacht[2]. Verwandte Gedankengänge hat gleichzeitig auch Sperry entwickelt[3].

Wir erwähnten bereits, dass optomotorische Reaktionen grundsätzlich nur bei passiver Vertragung gegenüber der Umgebung zu erwarten sind. Optische Reizung infolge der Eigenbewegung löst normalerweise keine solchen Reaktionen aus; jeder aktiven Bewegung entspricht eine ganz bestimmte Sinnesreizung, und das Tier ist über diese zu erwartende Reizung also von vornherein informiert. Es ist nun klar, dass künstliche Eingriffe, welche entweder die normale Bildwahrnehmung oder aber die normale Bewegung stören, auch die normale Beziehung zwischen beiden in einer für das Tier zunächst unkontrollierbaren Weise abändern müssen. Nur unter diesen künstlichen und anomalen Umständen können auch aktive Bewegungen zu «unerwarteter» Reizung und somit – indirekt – zu optomotorischen Reaktionen führen.

Ein schönes Beispiel des ersten Falles bildet das Verhalten der Fliege *Eristalis* mit 180° verdrehtem Kopf. Die Bildverschiebung auf der Retina entspricht nicht mehr der bei Eigenbewegung gewohnten; der Unterschied wird vom Tier offenbar als reale Verschiebung der Umgebung empfunden und dementsprechend optomotorisch beantwortet[4]. Ganz ähnlich verhalten sich Fische und Amphibien nach Verdrehung der Augen[3].

Beispiele des zweiten Falles bilden die Beobachtungen von Wolter und Tonner. Wolter sah optomotorisch gesteuerte Augenstielbewegungen bei *Carcinus maenas*, wenn das Tier am Rand einer grossen, kreisförmigen Glasschale entlang lief, bei ruhendem Streifenband. War der Kopf des Tieres dem Zentrum der Schale zugewandt, so schwenkte es die Augenstiele in der Richtung der Bewegung; war der Kopf auswärts gerichtet, entgegen der Bewegungsrichtung[5]. v. Buddenbrock sieht in diesen Versuchen «ein sehr deutliches Beispiel für die Tatsache, dass das Tier bei der optomotorischen Reaktion auf die durch die eigene Bewegung erzeugten Retinaverschiebungen reagiert»[6]. Wir möchten das Ergebnis dagegen folgendermassen deuten: Das Tier läuft aktiv etwa geradeaus, wird aber durch die Biegung der Schalenwand passiv in eine krumme Bahn gezwängt, das heisst ein wenig um seine Vertikalachse gedreht. *Diese passive Drehung* – und nicht die eigene Bewegung – verursacht die optomotorisch wirksame retinale Bildverschiebung[1]. Tonner beobachtete optomotorisch gesteuerte Körperkrümmungen bei Aeschnalarven, die am Ende eines horizontalen, um eine senkrechte Achse drehbaren Glasstabes befestigt waren und beim Schwimmen also zwangsmässig eine Kreisbahn zurücklegten[2]. Es drängt sich wiederum die gleiche Deutung auf: das Tier schwimmt aktiv etwa geradeaus, wird aber dabei *passiv um seine Vertikalachse gedreht.* Auf diese Drehung wird entsprechend reagiert.

Von grossem Interesse für das Verständnis der zentralnervösen Vorgänge bei diesen Reaktionen ist ein drittes Beispiel, welches v. Buddenbrock und Moller-Racke in ihrer eingangs erwähnten Arbeit veröffentlichten[3]. Es handelt sich in diesem Fall um den Rüsselkäfer *Calandra oryzae*, der nach Blendung des rechten Auges in homogener Umgebung im Bogen nach rechts läuft, in gestreifter Umgebung im Bogen nach links. Mit Recht erklären die Autoren das Verhalten «durch die Annahme, dass in der stehenden, gestreiften Trommel die retinalen Bildverschiebungen bei der Vorwärtsbewegung so wirken, als ob die Aussentrommel linksherum gedreht würde.» Dieses Ergebnis ist aber nicht so «unerwartet und paradox», als es den Anschein hat. Denn nach dem oben Mitgeteilten darf wohl ohne weiteres angenommen werden, dass auch in diesem Fall die optomotorische Reaktion deshalb ausgelöst wurde, weil die vom Tier *beabsichtigte* Bewegungsrichtung – etwa geradeaus – nicht mit der tatsächlich von ihm befolgten übereinstimmte. Die Rechtskrümmung seiner Bahn (in homogener Umgebung) ist eine typische «Zwangsbewegung»; sie ist dem Käfer infolge der ihm auferlegten Einäugigkeit offenbar ebenso unbemerkt aufgezwungen wie die Krümmung der Bahn bei *Carcinus* durch die runde Glasschale und bei der Aeschnalarve durch den rotierenden Glasstab.

Ist diese Deutung richtig, so lässt sich aus dem Verhalten des Tieres die Schlussfolgerung ziehen, dass mindestens zwei zentrale Instanzen beteiligt sind: eine übergeordnete, die etwa «Geradeauslaufen» veranlasst, und eine ihr untergeordnete Instanz, die diesen Befehl in einen unsymmetrischen Bewegungsantrieb umfälscht. Die höhere Instanz ist weder über diese Fälschung an sich unterrichtet noch über ihre Folgen, etwa auf Grund propriozeptiver Erregungen. Das spricht für eine geringe Bedeutung derartiger Erregungen einerseits bei der Bewegungskoordination (wenigstens an höchster Stelle), andererseits aber auch beim zentralen Vergleich der aktiv und passiv bedingten retinalen Bildverschiebung (einem Vergleich, der ja jeder optomotorischen Reaktion zugrunde liegen muss): das Tier richtet sich nur nach jener aktiv bedingten Bildverschiebung, welche bei der von ihm beabsichtigten Bewegung zu erwarten wäre.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass optomotorisches Verhalten in erster Linie dem Bedürfnis der Tiere nach Kompensation passiver Vertragung entspricht. Die Notwendigkeit, passiv und aktiv bedingte Sinnesreizung unterscheiden zu können, liegt also hier

[1] S. Dijkgraaf, Z. vgl. Physiol. *28* 389 (1941).

[2] E. v. Holst und H. Mittelstaedt, Naturwissenschaften *37*, 464 (1950).

[3] R. W. Sperry, J. comp. physiol. Psychol. *43*, 482 (1950).

[4] H. Mittelstaedt, Naturwissenschaften *36*, 90 (1949). – E. v. Holst und H. Mittelstaedt, Naturwissenschaften *37*, 464 (1950).

[5] H. Wolter, Zool. Jb. physiol. Abt. *56*, 581 (1936).

[6] W. v. Buddenbrock, *Vergleichende Physiologie*, Bd. I, *Sinnesphysiologie* (Verlag Birkhäuser, Basel 1952), S. 88.

[1] Bei einer Nachprüfung des Wolterschen Versuches konnten wir feststellen, dass die optomotorischen Augenstielbewegungen nur dann auftreten, wenn die Krabben an der Wand einer *runden* Schale entlang laufen, nicht dagegen beim Lauf entlang der *geraden* Wand eines Aquariums oder beim *freien* Lauf in der runden Schale. Dieses Ergebnis entspricht unserer Deutung (Anm. bei der Korrektur).

[2] F. Tonner, Z. vgl. Physiol. *25*, 427 (1938).

[3] W. v. Buddenbrock und Ingrid Moller-Racke, Exper. *8*, 392 (1952).

besonders auf der Hand. Durch Eigenbewegungen werden normalerweise keine optomotorischen Reaktionen ausgelöst. Scheinbare Ausnahmen sind immer durch künstliche Eingriffe oder anomale Umstände bedingt, die entweder zu einer anomalen Sinnesreizung führen oder aber dem Tier zu seiner aktiven, von ihm beabsichtigten Bewegung eine andere, *von ihm nicht intendierte* Bewegung auferlegen. Die optomotorische Reaktion wird dann durch jene zusätzliche Bewegung ausgelöst.

S. Dijkgraaf

Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, den 22. November 1952.

Summary

Flying and swimming animals need to be able to avoid passive displacement by air and water currents. Optomotor reactions essentially serve this purpose. The animals must be able to distinguish precisely between sensory stimulation caused by passive displacement and by active locomotion. Stimulation due to active movements does not release optomotor reactions. Apparent exceptions to this rule, occurring only under artificial circumstances, are caused by a derangement of either normal sensory stimulation or normal movement and, consequently, of their normal correlation. Examples of both cases are discussed.

Die Verfasser von *Neues zur Optomotorik der Insekten*[1] begrüssen es, dass Prof. S. Dijkgraaf mit seinen obigen Bemerkungen die Diskussion über dieses sehr aktuelle Thema eröffnet hat. Da es sich dabei um grundsätzliche Fragen handelt, werden sie an dieser Stelle in einem der nächsten Hefte der *Experientia* die Diskussion in Ausführlichkeit fortsetzen.

W. von Buddenbrock und
Ingrid Moller-racke

Zoologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Dezember 1952.

[1] W. v. Buddenbrock und Ingrid Moller-Racke, Exper. *8* 392 (1952).

PRO LABORATORIO

A New Microtome for Ultrathin Sectioning for High Resolution Electron Microscopy[1]

Several conventional microtomes have been adapted for ultrathin sectioning, the most successful of which has been the Spencer rotary microtome model 820[2]. Some special microtomes for ultrathin sectioning have been devised, the most advanced of which is the microtome designed by K. R. Porter. The microtome reported on in this paper represents a further development of the microtome designed by Porter.

The experience regarding ultrathin sectioning gained by using a specially trimmed Spencer microtome has provided the basis on which this new simple and reliable microtome has been constructed. The following conditions have to be satisfied in order to make it possible to produce ultrathin sections:

(1) All movements should be free from vibrations.

(2) The advance mechanism should not allow any static friction to interfere with the movement of the block-holding system.

(3) The advance movement should be as minute as 200 Å or less between each cutting.

(4) The sections should be collected on a liquid surface.

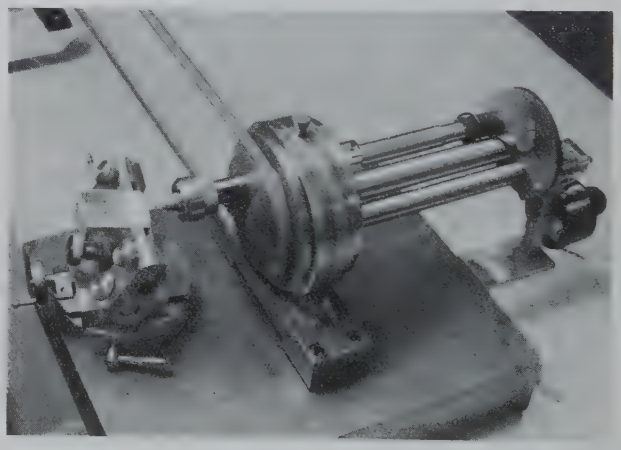
(5) The knife edge should be passed only once during a cutting cycle.

These conditions have been satisfied by using a circular, continuous movement, the block passing the cutting edge when moving downwards and passing at the side of the knife when moving upwards.

This motion has been possible by using a rotating wheel, on which the block is placed excentrically (Fig.) A motor is used to rotate the wheel, the pulling force being applied by means of a v-belt.

For the advance mechanism, the principle of thermal expansion is used but made in such a way that it can be thoroughly calibrated. A steel bar is mounted on the one side of the wheel insulated by means of plexi-glass from the rest of the microtome and can be heated by passing an electric current through a wire, coiled around its one end.

This steel bar pushes another steel bar carrying the block-fastening system towards the knife edge. This is made possible by the second steel bar passing through a hole in the wheel, the block-fastening system being fastened to the end protruding on the other side of the wheel.



Prototype of the new microtome for ultrathin sectioning. For explanation, see text.

As cutting edge razor blades are used, sharpened with a technique described in a previous paper[1]. The razor blade is mounted in a curved position and an attached trough[2] makes it possible to collect the sections on a liquid surface.

The advance movement of the block is almost linear for a period of more than 15 min and for routine work is set at an advance of less than 200 Å between each cutting. The microtome wheel makes 60 revolutions a minute, the amount of sections obtained in one period thus being quite sufficient.

The heated steel bar is cooled to room temperature in 4–5 min by means of a fan.

[1] This microtome will be produced commercially by LKB-Products, Stockholm, Sweden.

[2] D. C. Pease and R. F. Baker, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *67*, 470 (1948). – M. E. Gettner and J. Hillier, J. appl. Phys. *21*, 889 (1950). – J. Hillier and M. E. Gettner, Science *112*, 520 (1950). – S. B. Newman, E. Borysko, and M. Swerdlow, J. Res. Nat. Bur. Standards *4*, 43, 183 (1949).

[1] F. S. Sjöstrand, J. Cell Comp. Physiol. (in press).

[2] M. E. Gettner and J. Hillier, J. appl. Phys. *21*, 889 (1950).

With the advance of less than 200 Å, a complete section is cut every time the block passes the knife. Serial sections have thus been obtained, the thickness of which is about 200 Å. The thinnest sections obtained up till now have been measured to 70 Å. The thickness has been measured at the edge of the section on sections shadowed with chromium without dissolving the embedding medium.

The knife edge used makes it possible to obtain sections with very minute, or within large areas no indications of knife marks.

With this sectioning technique, sections whose thickness is less than 200 Å may easily be cut and in a reproducible way. This means that the thickness of the sections no longer represents a limiting factor as regards the resolution that can be obtained even when dealing with specimens exhibiting pronounced opacity to the electron beam. The limiting factor is now—when using a perfect electron microscope—the contrast of the material investigated.

A resolution of 20–25 Å has been measured on ultrathin sections through dense structures, as for example the myelin sheath of osmium fixed myelinated nerve fibres[1].

The construction of the microtome and the technique used will be described in greater detail elsewhere.

F. S. Sjöstrand

Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, November 5, 1952.

Zusammenfassung

Die prinzipielle Konstruktion eines neuen Mikrotoms zur Herstellung ultradünner Schnitte wird beschrieben. Mit diesem Mikrotom sind Schnitte hergestellt worden, die dünner als 100 Å waren.

[1] F. S. Sjöstrand, Exper. (in press).

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Dirichlet's Principle, Conformal Mapping, and Minimal Surfaces

By R. Courant

330 pages with 38 figures
With an appendix by M. Schiffer
(Interscience Publishers, New York, 1950)
($4.50)

Das Genie Bernhard Riemanns hat der Mathematik vollständig neue Aspekte eröffnet, aber auch Danaergeschenke hinterlassen, die den Nachfolgern schwer zu schaffen gemacht haben. Wir denken da an die Anwendung der Zetafunktion in der Zahlentheorie und diejenige des Dirichletschen Prinzips in der Funktionentheorie. Während das erste bis heute nicht befriedigend behandelt werden kann, ist das zweite hauptsächlich seit den Arbeiten Hilberts zu einem Arbeitsmittel geworden, das jeder Kritik standhält.

Das Dirichletsche Prinzip ist aber ein Prinzip der Variationsrechnung und hat deshalb Anwendungsgebiete in Minimalproblemen, die mit der Funktionentheorie nichts mehr zu tun haben. So hat es Prof. R. Courant auf das allgemeine Plateausche Problem (Minimalflächen mit gegebenem Rand) und auf das Douglassche Problem angewandt. Das vorliegende Buch enthält eine geschlossene Darstellung des Prinzips und seiner Anwendung auf konforme Abbildung und die beiden obengenannten Probleme.

Es ist hinreichend bekannt, welchen Einfluss die Arbeiten Courants auf die Mathematik und die theoretische Physik gehabt haben, bietet doch das Buch von Courant-Hilbert, *Methoden der mathematischen Physik*, den Schlüssel zu einem wichtigen Teil der modernen theoretischen Physik. Man wird nicht fehlgehen, wenn man dem vorliegenden Buch einen entsprechenden Einfluss prophezeit.

Die Darstellungsweise Courants ist hier womöglich noch mehr kristallisiert als in früheren Arbeiten; im Vorwort bezeichnet er dieses Buch auch als beispielhaft für seine mathematische Methode. Diese ist denn auch im eigentlichen Sinne mathematisch, es wird viel gedacht und wenig gerechnet. Es erstaunt auf den ersten Blick, wieviel Text und wie wenig Formeln in einem Buch stehen, dessen Thema Potentialtheorie und Variationsrechnung sind. Allerdings wird beim Leser eine gründliche Vorbildung vorausgesetzt; das Buch wendet sich an Mathematiker.

Das Buch beschäftigt sich im wesentlichen mit Existenzbeweisen. Diese werden im allgemeinen von Physikern unterlassen und von Mathematikern nur gemacht, weil es eben sein muss. Courant sagt, dass erst ein Existenzbeweis die Richtigkeit der mathematischen Theorie einer physikalischen Erscheinung erweist. Das Gewicht liegt nicht auf den Ergebnissen – so umfassend diese auch sind – sondern auf der Methodik. Jedem Beweis geht eine Exposition des Gedankenganges voran; der Beweis selbst ist meist recht knapp ausgeführt. Häufig werden als heuristisches Mittel physikalische Bilder verwandt; der Kontakt mit der Anschauung geht – auch im Abstrakten –, nie verloren. Es wird sozusagen in einem weiteren Sinne mit dem Dirichletschen Prinzip gearbeitet: so wie Riemann die Probleme angepackt hat, dabei aber mit Weierstraßscher Strenge.

Das Buch bietet eine Fülle von Anregungen; man kann es nicht aus der Hand legen, ohne Lust zu bekommen, sich auch mit dieser lebendigen (und unerwarteten) Entwicklung zu beschäftigen.

Inhalt: 1. Kapitel: *Diskussion und Beweis des Dirichletschen Prinzips.* 2. Kapitel: *Konforme Abbildung auf Parallelschlitzbereiche.* 3. Kapitel: *Das Platausche Problem.* 4. Kapitel: *Das allgemeine Douglassche Problem.* 5. Kapitel: *Konforme Abbildung mehrfach zusammenhängender Bereiche.* 6. Kapitel: *Minimalflächen mit freier Berandung und instabile Minimalflächen.* Anhang (M. Schiffer): *Einige neue Entwicklungen in der Theorie der konformen Abbildung.*

K.-F. Moppert

Physical Geography

By Arthur N. Strahler

442 pages, with about 300 figures and photographes
(John Wiley & Co., New York, 1951)
($6.–)

Der Begriff der physischen Geographie ist in diesem Textbook in weitestem Sinne gefasst. Astronomie, Geodäsie, Geologie und Meteorologie u.a. sind, wie der Autor in der Einleitung schreibt, wohl selbständige Wissenschaften, müssen aber zum vollen Verständnis der Erde, ihrer Oberfläche und ihrer Bewohner in der physischen Erdkunde einbezogen werden. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn das als Lehr- und Übungsbuch gedachte Werk in verschiedenen Kapiteln nicht über das Elementare hinauskommt.

Der Aufbau ist dreigeteilt. Der erste Teil handelt über die Erde als Kugel, der zweite von Karten, Oberflächenformen, Gesteinen und «Structures», der dritte von Wetter und Klima, natürlicher Vegetation und vom Boden.

Der erste Teil umfasst in anschaulicher, elementarer, vollständiger Form die Gestalt und Gradeinteilung der Erde, die Kartenprojektionen und -beleuchtungen und enthält auch einen Abschnitt über Zeit, Mond, Ebbe und Flut. Der zweite Teil handelt von Karten, Oberflächenformen, von den Gesteinen, von Verwitterung, Erosion und Grundwasser, der Formentstehung durch Flüsse, Gletscher, Wellen und Wind, Küstenebenen, horizontaler Schichtung, Domen und endlich von Falten, Brüchen, «kristallinen Massen» und vulkanischen Formen. Dabei ist zwar bemerkenswert, dass dem eigentlichen morphologischen Teil (S. 144–229) ein Abschnitt über die verschiedenen Gesteine vorausgeht; aber in den morphologischen Abschnitten selbst findet man eigentlich zu wenig Hinweise darauf, inwiefern und wie sehr die Oberflächenformen von der Beschaffenheit (Härte, Gefüge usw.) des Untergrundes abhängt.

Neue Wege beschreitet Strahler im dritten Hauptabschnitt über «Wetter und Klima». Nach kurzen Einleitungen, welche die wichtigsten klimatischen Elemente und deren Messung behandeln, versucht der Autor, an Hand neuester meteorologischer Erkenntnisse eine klimatische Systematik zu geben. Als Basis seiner Klassifikation dienen die troposphärischen Luftmassen, das heisst deren Ursprungsgebiete, Verlagerungen und Fronten. Die drei Hauptklimazonen sind zwar in ihrer räumlichen Ausdehnung nicht scharf abgegrenzt – jede klimatische Grenze steht ja nur für eine Übergangszone –, sondern vielmehr auf einer übersichtlichen Klimakarte der Erde an Orten typischer Ausbildung des betreffenden Luftmassenregimes als Kernzone dargestellt. Der dieser Klimaklassifikation zugrunde liegende Gedanke ist ohne Zweifel ausbaufähig und dürfte in naher Zukunft weiteren, über den Umfang eines Textbuches hinausgreifenden Untersuchungen rufen, die ja gerade im Gebiete der seit geraumer Zeit stagnierenden klimatischen Systematik so dringend notwendig sind.

Das Kapitel über «natürliche Vegetation» beschränkt sich auf einige Angaben über Vegetationstypen in den verschiedenen Klimabereichen, während das Kapitel über «Pedologie» eine auf knapp 20 Seiten zusammengedrängte Übersicht über die wichtigsten Bodengruppen gibt.

Hervorzuheben sind die hervorragenden Graphiken, die allein «Physical Geography» zu einem für Mittel- und Hochschule gleicherweise verwendbaren Demonstrationsmittel machen. Für den europäischen Leser ist noch beizufügen, dass in diesem Textbook je am Ende eines Kapitels Repetitionsfragen und Übungen angefügt sind.

Wie man dies von amerikanischen Textbooks ganz allgemein gewohnt ist, herrscht auch hier, wenn auch vielleicht in geringem Masse, ein gewisser Isolationismus in bezug auf die Auswahl der Beispiele. Das Werk ist in bemerkenswerter Weise frei von sachlichen Irrtümern und Druckfehlern. (S. 180 Schweiz, nicht Schweitz; S. 251 Der Schweiz. Jura kann kaum als «foot hill range» der Alpen bezeichnet werden. Zudem gehört der französische Jura mehrheitlich zum Tafeljura.)

In einem besonderen gleichformatigen Heft («Visual Aids», 32 Seiten) ist eine Liste der farbigen Diapositive, die parallel zum Unterricht als Beispiele benutzt werden können, enthalten. Die Liste ist in Abschnitte eingeteilt, die den Kapiteln des Lehrbuches entsprechen. Auch hier ist die Auswahl der Beispiele sehr gut, wenn auch regional etwas einseitig. Die Diapositive (Leicaformat) sind beim gleichen Verlag erhältlich.

D. Brunnschweiler und
G. C. Amstutz

Lehrbuch der Röntgendiagnostik

Von H. R. Schinz, W. E. Baensch, E. Friedl und E. Uehlinger

Bd. I (1407 teilweise mehrfarbige Abbildungen, 57 meist zweifarbige Tafeln), Bd. II (1269 teilweise mehrfarbige Abbildungen, 30 Tafeln): *Skelett*
(Verlag G. Thieme, Stuttgart 1951/52)
(1. Lieferung DM 66.–, 2. Lieferung DM 70.–,
3. Lieferung DM 82.–, 4. Lieferung DM 84.–)

Nachdem die Unterlagen des Schinzschen Lehrbuches den Ereignissen des Krieges zum Opfer gefallen sind, ist dieses Standardwerk der Röntgendiagnostik dank einem grossen Aufwand an Arbeit von seiten der Autoren und des Verlages in kurzer Zeit neu erstanden. Die in 4 Lieferungen erschienenen Kapitel über die Röntgenuntersuchung des Skelettes liegen als Band I und II nun vollständig vor. Ihr Umfang hat gegenüber der 4. Auflage um mehr als das Doppelte zugenommen. Nach einer einleitenden Erörterung der Grundlagen der Röntgendiagnostik mit den neu aufgenommenen Abschnitten über Mikroröntgenographie und Prinzip des Schirmbildverfahrens werden die radiologischen Befunde der einzelnen Knochenerkrankungen dargestellt. Den Abschluss bilden die Kapitel über die Weichteile des Bewegungsapparates einschliesslich der Gefässe, der Brust- und Speicheldrüsen und über die Fremdkörperdiagnostik.

Die Klassierung der Fülle dieses Materials wurde noch mehr als in früheren Auflagen nach klinischen und pathologisch-anatomischen Gesichtspunkten vorgenommen, wobei ein Teil der Kapitel neben einer beträchtlichen Erweiterung eine wesentliche Umarbeitung erfahren hat. Dadurch hat die Darstellung an Übersichtlichkeit gewonnen, und es wurde nicht nur das Auffinden einzelner pathologischer Befunde, sondern auch die Orientierung über zusammenhängende Krankheitsgruppen erleichtert, was vor allem für den Kliniker von grossem Wert ist. Die Bildausstattung ist vorzüglich. Neben der grossen Zahl typischer Röntgenbilder finden sich instruktive Zeichnungen und schematische Darstellungen.

Das Lehrbuch der Röntgenologie von Schinz bedarf keiner besonderen Empfehlung. Man kann lediglich die Herausgeber und den Verlag zu dieser Neuauflage beglückwünschen.

H. Lüdin

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

La place des éléments transuraniens dans le système périodique

Par M. Haïssinsky, Paris[1]

Le tableau périodique établi par Mendéléiev en 1869 contenait 63 éléments. On en a découvert depuis 35 autres, soit séparément, soit par petits groupes (gaz rares, radioéléments naturels, transuraniens). Leur addition à l'ancien tableau s'est produite chaque fois sans sérieuses difficultés et sans provoquer des controverses, à l'exception toutefois des derniers éléments, les transuraniens.

Pour des considérations théoriques on s'attendait à ce que la répartition des électrons de valence dans les atomes de la septième période conduise à une nouvelle «anomalie horizontale» qui se traduirait par une stricte analogie chimique de certains éléments voisins de cette période. Mais si Seaborg considère[2] que c'est l'élément de nombre atomique 89, l'actinium, qui est le point de départ de cette nouvelle série, appelée «actinides», d'autres auteurs parlent de *thorides*, *uranides* ou même *protactinides*. Nous allons nous arrêter, en particulier, sur l'hypothèse des actinides qui a eu un grand succès auprès de nombreux chimistes. Dans un grand nombre de publications et monographies récentes, les «actinides» sont placés en bas du système périodique, au-dessous des lanthanides, selon le chéma suivant (Tableau I):

Nous allons supposer un instant que l'évolution historique de la connaissance des éléments ait été telle que les physiciens, par l'étude des propriétés spectrales, électriques, magnétiques et autres des atomes soient parvenus à établir la distribution des électrons en couches et orbites avant que le comportement chimique des éléments soit connu. Une classification chimique correcte de ceux-ci aurait-elle été alors possible ? En d'autres termes, la connaissance du tableau Bohr-Stoner qui représente la distribution électronique des atomes, aurait-elle permis d'établir le tableau de Mendéléiev ? Il est permis d'en douter. Certes, on aurait probablement prévu la valence o pour les gaz rares, la valence I pour les métaux alcalins, II pour les alcalino-terreux, peut-être même la valence négative I et positive VII pour les halogènes (en commettant ainsi une erreur pour F et Br, qui n'ont pas la dernière valence). Mais il est peu probable qu'on aurait pu, d'après la répartition des électrons périphériques de Fe, Co, Ni, prévoir les valences II et III de ceux-ci ou que le ruthénium avec ses 7 électrons *4d* et un électron *5s* pourrait posséder tous les degrés d'oxydation entre I et VIII, tandis que Pd avec ses 10 électrons *4d* serait bi- et trivalent. Même dans le cas des lanthanides, la distribution électronique pour certains d'entre eux n'est pas si simple pour pouvoir en conclure à la prédominence de la valence III. Les prévisions sont encore plus malaisées pour les éléments de la 7e période, étant donné que les différences énergétiques entre les orbites *6d* et *5f* sont probablement très faibles et les transitions entre les divers états électroniques sont faciles.

Tableau I

57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Er	68 Ho	69 Tm	70 Yb	71 Lu
89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf					

Le thorium serait ainsi l'homologue du cérium, le protactinium (essentiellement pentavalent) du praséodyme (trivalent), l'uranium (de valence maximum VI, stable) du néodyme (trivalent), etc.

Il faut remarquer que l'hypothèse des actinides, telle qu'elle est généralement formulée, implique, en réalité, 3 suppositions partielles, dont le bien-fondé mérite d'être examiné attentivement:

1° A partir d'un certain nombre atomique dans la 7e période, les électrons de valence additionnels n'occuperaient pas les orbites *6d* qui correspondraient à une succession normale dans les couches, mais les orbites *5f*, de même que dans la 6e période les électrons de valence se logent à partir de La sur les orbites *4f* et non *5d*.

2° L'élément portant ce nombre atomique serait l'actinium, le troisième dans la période, comme le lanthane est le troisième dans la 6e période.

3° Cette distribution déterminerait la similitude chimique des «actinides», notamment la prédominance de la valence III, de même que celle-ci est caractéristique, dans la sixième période, des «terres rares».

Nous allons examiner en premier lieu la dernière hypothèse qui correspond à une conception bien répandue et selon laquelle la répartition électronique détermine d'une façon directe et prévisible les propriétés chimiques des éléments.

La première et la deuxième suppositions, apparition d'électrons *5f* à partir d'Ac, sont encore moins certaines. J'ai résumé, il y a quelque temps, les résultats des mesures physiques et des recherches théoriques entreprises depuis de nombreuses années en vue d'élucider cette question[1].

On a pu en conclure que le thorium et ses ions à l'état fondamental n'ont pas d'électrons *5f* et que les données concernant l'uranium sont confuses et contradictoires; on n'avait alors aucune mesure physique pour le protactinium. Nous reviendrons plus loin sur les mesures magnétiques et cristallographiques faites plus récemment sur Th, Pa, U, Np, Pu ou leurs composés.

Nous venons cependant de voir que les considérations purement électroniques sont loin de pouvoir donner à l'heure actuelle une solution satisfaisante au problème posé. Il n'est certes pas question de nier les relations étroites qui existent entre propriétés chimiques et structure électronique, mais en essayant d'assigner aux nouveaux éléments des places dans le tableau périodique, on devrait s'inspirer des principes qui ont permis à Mendéléiev d'établir son système et qui ont assuré à celui-ci son succès éclatant, définitif.

Le tableau périodique est une classification essentiellement chimique et, par conséquent, c'est la considération des propriétés chimiques qui doit surtout nous guider

[1] Institut du Radium, Faculté des Sciences, Paris.

[2] Voir, par exemple: G. Seaborg, Nucleonics *5*, 16 (1949).

[1] M. Haïssinsky, J. Chem. Soc. London *1949*, Suppl. 2, 241; voir aussi: J. Chim. Phys. *47*, 415 (1950).

Tableau II

$_{87}$Fr	$_{88}$Ra	$_{89}$Ac	$_{90}$Th	$_{91}$Pa	$_{92}$U	$_{93}$Np	$_{94}$Pu	$_{95}$Am	$_{96}$Cm	$_{97}$Bk	$_{98}$Cf
1	*2*	*3*	(3) *4*	*4, 5*	(3) 4 (5) *6*	3, *4, 5, 6*	3, *4*, 5, 6	(2) *3*, (4) 5, 6	*3*	*3*, 4	*3*

pour l'arrangement de nouveaux éléments. On ne doit pas oublier, d'autre part, que la succession des éléments dans les périodes et les groupes est accompagnée d'une variation de propriétés qui a le caractère d'une *évolution*, parfois complexe, et qui ne s'exprime pas toujours par de simples analogies, facilement prévisibles. Ceci revient à dire qu'en premier lieu on doit prendre en considération les propriétés chimiques *fondamentales* des éléments, sans se laisser égarer par des propriétés secondaires, lesquelles seront plus facilement comprises, lorsque la classification correcte sera bien établie. La classification doit donc d'abord faire appel aux états de valence, en particulier à la valence maximum, à la stabilité relative des diverses valences en solution et à l'état solide, ensuite aux électro-positivités et plus généralement aux caractères électro-chimiques, etc.

C'est alors aussi qu'on pourra faire des rapprochements avec les renseignements fournis pas l'étude des propriétés physiques, soit pour une compréhension plus approfondie de la classification à l'aide de la structure électronique, si celle-ci est connue, soit pour trouver quelques indications sur cette structure, si elle est encore douteuse.

Nous nous limiterons ici à la considération des états de valence actuellement connus pour les éléments de la 7^e période, qui sont donnés ci-après. Les plus stables en solution aqueuse sont en italique les très instables sont entre parenthèses (Tableau II).

On peut distinguer immédiatement trois groupes. 1° La valence maximum croît régulièrement de Fr à U. On ne peut avancer aucun argument sérieux pour enlever ces éléments de leurs groupes habituels, de I à VI. En particulier, les propriétés chimiques d'Ac, Th, Pa et U sont tellement différentes et les séparations de ces éléments sont tellement faciles, que ceux-ci ne rappellent pas, en tant que groupe, même de loin, les lanthanides La-Nd. La valence III, caractéristique de ces derniers et d'Ac, joue un rôle insignifiant dans la chimie des autres membres du groupe.

Cette conclusion ne peut pas être modifiée, quelles que soient les propriétés des nouveaux éléments récemment découverts. Par conséquent, le comportement des transuraniens ne peut pas apporter des arguments significatifs en faveur d'une hypothèse qui prétend placer Th, Pa et U dans une famille «d'actinides»[1].

2° On voit, d'autre part, que les éléments 92-95 ont pratiquement les mêmes états de valence, mais que la stabilité relative des valences inférieures croît avec le nombre atomique. Cette évolution, qui est même plus prononcée pour les composés à l'état solide, n'est pas nouvelle dans le système périodique: elle rappelle le comportement des triades Ru, Rh, Pd et Os, Ir, Pt. A la stabilité près, les 4 éléments U-Am ont dans le même état d'oxydation des propriétés très voisines. Nous sommes ainsi en présence d'une véritable *tétrade* que nous appellerons *uranides*. Les analogies dans le même état de valence s'étendent également aux éléments cis-uraniens, bien que les propriétés de Pa^v soient très différentes des uranides pentavalents; ceux-ci sont notamment beaucoup moins hydrolysables. Malgré leurs analogies, les uranides se séparent sans trop de difficultés les uns des autres, par le fait que leurs potentiels d'oxydo-réduction sont suffisamment différents. Il est donc impossible d'ignorer ou de minimiser pour ces éléments la chimie des états de valence supérieurs à III, tandis que ceci peut se faire pratiquement sans inconvénient pour les lanthanides.

3° On doit, enfin, reconnaître que la chimie du curium et surtout du berkélium et du californium est encore loin d'être suffisamment connue. La trivalence de Cm est bien établie et jusqu'ici on ne connaît pas d'autres valences de cet élément. Le brusque passage d'Am avec ses valences multiples à Cm ayant une seule valence est toutefois assez étonnant. Bk a les valences III et IV, la première étant la plus stable[1]. A Cf on attribue la valence III, mais Seaborg et ses collaborateurs n'excluent pas la possibilité d'existence d'un état pentavalent[2]. Il faut signaler que la courbe d'élution obtenue au cours de la séparation de ces 3 éléments par échange ionique présente une grande similitude avec celle des lanthanides Gd, Tb et Dy. Seaborg insiste sur cette particularité[3], car, selon l'hypothèse des actinides, ces derniers éléments sont précisément les homologues de Cm, Bk et Cf. Bien qu'une seule propriété ne soit pas suffisante à caractériser un groupe d'éléments, nous allons admettre cette homologie qui est rendue déjà plausible par ce que nous avons sur les valences. Ceci naturellement n'implique pas une extrapolation du parallélisme jusqu'à Pu ou U qu'on considérerait alors comme homologues de Sm et Nd ou jusqu'à Pa qui serait l'homologue de Pr.

Les faits chimiques qui viennent d'être brièvement exposés donnent quelques indications très générales sur les configurations *probables* des électrons périphériques dans la 7^e période. On peut notamment penser que ces électrons occupent les orbites *7s* et *6d* dans les atomes allant jusqu'à Pa, qu'ils ont un caractère mixte de *6d* et *5f* dans les uranides, et qu'à partir de Cm les orbites *5f* sont définitivement favorisées. Il est intéressant de noter que Dawson a abouti très récemment[4] à des conclusions semblables d'après les mesures magnétiques effectuées par lui-même ou par d'autres auteurs. Le tableau suivant de Dawson donne, d'après ces mesures, le nombre d'électrons des orbites *6d* et *5f* dans divers composés de Th-Cm (Tableau III).

Bien qu'encore incomplètes, ces mesures montrent que même dans certains composés de Pu (PuO_2^{++}) on a encore des électrons *6d*. D'autre part, les mesures cristallographiques de Zachariasen sur Th, Pa et U métalliques ont conduit cet auteur à conclure que «la présence d'électrons *5f* dans ces métaux est définitive-

[1] Cette hypothèse est particulièrement contredite par la chimie de Pa. Ses partisans semblent souvent la négliger ou considèrent par exemple que «la chimie de Pa en solution reste en grande partie un mystère» (J. J. Katz et W. M. Manning, Ann. Rev. Nucl. Sci. *1*, 250 [1952]). En réalité, cette chimie n'est pas plus mystérieuse que celle des homologues Nb et Ta; mais elle présente de grandes difficultés dues à la propriété commune de ces éléments, de ne pas avoir un comportement autonome, lorsque l'un se trouve en présence d'un excès d'un de ces deux autres ou d'un élément apparenté chimiquement (Zr, Ti, etc.). Pour plus de détails, voir M. Haïssinsky et G. Boussières, Bull. Soc. chim. France *18*, 146, 557 (1951).

[1] S. Thompson, B. Cunningham et G. Seaborg, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 2798 (1950).

[2] K. Street, S. Thompson et G. Seaborg, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 4832 (1950).

[3] Communication personnelle.

[4] J. Dawson, Nucleonics *10*, 39 (1952).

Tableau III

Nombre d'électrons	*6d* *5f*	0	1	2	(3) (3)	4	5	6	7
Th U Np Pu Am Cm		Th^{4+} UO_2^{++}	Th^{3+} NpO_2^{++} ?	Th^{++} U^{4+} NpO_2^{+} PuO_2^{++}	U^{3+}	(U-métal) Pu^{4+}	Pu^{3+}	Am^{3+}	Cm^{3+}

ment exclue», tandis que le neptunium-métal aurait tout au plus un seul électron $5f$[1]. Ainsi *la base électronique de l'hypothèse des actinides, déjà en désaccord avec les faits chimiques, est erronée.* Quel arrangement devons-nous donc adopter d'après ces faits?

Il n'y a aucune difficulté pour les éléments compris entre Fr et U: on doit les laisser dans leurs groupes de I à VI. Les analogies très prononcées entre les quatre uranides suggèrent que ceux-ci doivent être réunis dans la même position VI*a*, de même que les triades sont rangées dans le groupe VIII. Avant la découverte de Bk et Cf on pouvait ajouter le curium aux uranides, bien qu'on ne lui connaisse qu'une seule valence; la situation n'aurait pas été encore très différente de celle des triades, dont le nombre de valences va aussi en décroissant. Un tel arrangement ne semble plus être satisfaisant si on veut différencier des uranides le curium, le berkélium et le californium que nous pouvons considérer comme une famille de *curides* (Tableau IV).

Les deux schémas suivants, qui sont équivalents, répondent à ces préoccupations et respectent l'évolution chimique, assez complexe, des derniers éléments, actuellement connus, du système périodique. On adoptera l'un ou l'autre selon qu'on préfère mettre les lanthanides en bas du tableau ou les laisser encadrés au milieu. Implicitement, ils expriment notamment l'idée que la répartition électronique normale est perturbée dans la 7e période. Les curides y figurent comme éka-lantanides, étant placés comme homologues de Gd, Tb et Dy. Si cette petite famille s'enrichit ultérieurement de nouveaux membres, ceux-ci trouveront leur place dans les cases laissées vides après Cf.

Le nombre maximum d'électrons dans une orbite *f* étant 14, on peut supposer que le nombre atomique du dernier curide soit 103. Par contre, il est plus difficile de prévoir à quels groupes appartiendraient l'élément 104 et les suivants. Aurait-on une réapparition des électrons *6d* dans un éka-thorium, ou d'autres orbites plus éloignées seraient-elles préférées? N'aurait-on pas de nouveau une structure électronique mixte dont résulterait une évolution chimique imprévisible?

Il est cependant possible que la nature se soit arrangée pour enlever à ces spéculations tout intérêt réel: au delà du nombre atomique 100 on s'approcherait rapidement du domaine de l'instabilité nucléaire absolue et les atomes n'auraient plus de durées de vie observables, par suite de la fission spontanée très rapide des noyaux.

Summary

The distribution of the peripheral electrons in the atoms is not always sufficient in itself for the chemical characterisation of the elements and their classification

[1] W. Zachariasen, Acta crist. *5*, 19 (1952); Ann. Rev. Phys. Chem. *3*, 359 (1952).

A. *Tableau IV*

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII			0
55 Cs	56 Ba	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho
68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt		
79 Au	80 Hg	81 Tl		82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At					86 Rn
87 Fr	88 Ra	89 Ac		90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf
							uranides			curides		

B.

55 Cs 79 Au 87 Fr	56 Ba 80 Hg 88 Ra	57 La–71* 81 Tl 89 Ac	72 Hf 82 Pb 90 Th	73 Ta 83 Bi 91 Pa	74 W 84 Po	75 Re 85 At 92 U–98**	76 Os	66 Ir	78 Pt	86 Rn

* Lanthanides

57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu

**uranides curides

92 U	93 Np	94 Pu	95 Am				96 Cm	97 Bk	98 Cf					

in the periodic system. In making this classification one ought to take into consideration principally the *fundamental* chemical properties, namely the maximum valency, the relative stabilities of the various oxidation states, etc. Such considerations exclude the possibility of gathering the elements of atomic numbers 89–98 into a single family. A complex evolution of chemical properties is rather observed in the 7th period. It can be summarised as follows:

(1) The elements from Fr to U ought to be arranged normally in the vertical groups I–VI.

(2) The three following elements Np, Pu, Am have strict analogies with U and form a *uranide* group with it.

(3) Starting with Cm, there is a predominance of valency III and the appearance of a *curide* group whose proprieties seem to be close to those of the lanthanides Gd, Tb, Dy...

This arrangement is in agreement with the most recent physical measurements on the electronic distribution.

CONGRESSUS

Suisse

Un cycle de Conférences sur

Quelques problèmes actuels de virologie

aura lieu du 22 au 23 mai 1953 à Lausanne

Programme

H. FLÜCKIGER: Problèmes de l'immunisation contre la fièvre aphteuse dans la pratique.

PH. L'HÉRITIER: Le virus héréditaire de la drosophile.

G. CATEIGNE: Problèmes actuels concernant les virus de la grippe.

KENNETH SMITH: Le problème de la latence et de l'infection croisée dans les maladies à polyhèdres des insectes.

J. VERGE: Le problème de l'immunisation dans les maladies à virus des animaux.

EMMA KLIENEBERGER-NOBEL: Les organismes du groupe de la pleuropneumonie, la phase L des bactéries et leurs relations possibles avec les virus.

P. HAUDUROY: Les virus endormis.

P. LÉPINE: Notions récentes sur l'épidémiologie et l'immunité dans la poliomyélite.

A. PENSO: Attaque et démolition de la cellule bactérienne par les phages.

L'inscription au cycle de conférences est fixée à 15 francs suisses, payables à Lausanne.

Pour les inscriptions et pour tous renseignements, s'adresser au Prof. HAUDUROY, 19, rue César-Roux, Lausanne.

Canada

XIXth International Physiological Congress Montreal

A symposium on *The Future and Limitations of Physiology* will be held under the auspices of the International Union of Physiological Sciences in Montreal during the meetings of the XIXth International Physiological Congress (August 31st–September 4th, 1953). The symposium has been made possible by a grant from the International Council of Scientific Unions.

The participants will be especially invited. The first meeting of the symposium will be a public one, and Congress members will be given the opportunity of speaking from the floor.

Booklets of General Information for the XIXth International Physiological Congress, to be held in Montreal, Canada, from August 31st to September 4th, 1953, have recently been mailed to the headquarters of the appropriate scientific societies throughout the world. Members of these societies will receive the booklets from the headquarters of their societies. Others who wish to receive the information should write directly to "The Executive Secretary, Physiological Congress Office, McGill University, Montreal".

The Booklets contain forms for registration for the Congress and for the submission of communications and demonstrations.

Owing to an oversight, no form has been included for the submission of films other than those used to illustrate ordinary communications. Prospective members of the Congress who wish to show such films should write to the Congress Office before May 1st, 1953 stating the names of the authors, the title of the film, the running time, and whether 16 mm or 35 mm, silent or sound.

Die Therapie mit Calcium-Verbindungen erfuhr durch die Herstellung des nicht nur intravenös, sondern auch intramuskulär gut verträglichen

Calcium-Sandoz

eine erhebliche Erweiterung. In enger Zusammenarbeit mit Klinikern und Pharmakologen schufen die Forschungslaboratorien Sandoz ein Präparat, welches das unbedingte Vertrauen des Arztes gewonnen hat.

Die Ergebnisse einer 25jährigen klinischen Erfahrung mit Calcium-Sandoz sind in einer Monographie über die Calcium-Therapie zusammengefasst. Sie steht Interessenten zur Verfügung.

SANDOZ A.G.

IM VERLAG BIRKHÄUSER ERSCHEINEN IN KÜRZE:

Buchner

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

Von Prof. Dr. *P. Buchner*, vormals o. ö. Professor der Zoologie an der Universität Leipzig. 772 Seiten mit 336 Figuren. Ganzleinen Fr. 66.50.

Nachdem seit der letzten umfassenden Bearbeitung des Zoologen und Physiologen, Bakteriologen und Mykologen in gleicher Weise interessierenden Gebietes 20 Jahre verflossen sind, wird es in diesem reichillustrierten Buch erneut von seinem besten Kenner erschöpfend behandelt.

v. Buddenbrock

Vergleichende Physiologie

In 6 Bänden. – Von Prof. Dr. *W. von Buddenbrock*, Professor an der Universität Mainz.

Band II: Nervenphysiologie

396 Seiten mit 183 Figuren. Ganzleinen Fr. 38.50.

Inhalt: Nervensystem der Protozoen – Nervenphysiologie der Metazoen – Einleitung und Allgemeines – Coelenteraten – Echinodermen – Enteropneusten – Niedere Würmer – Anneliden – Arthropoden – Mollusken – Tunikaten und Akranier – Wirbeltiere: Grosshirn – Zwischen- und Mittelhirn – Kleinhirn – Medulla oblongata – Rückenmark.

Richter

Elektrische Maschinen

In 5 Bänden. Von Prof. Dr. *R. Richter*, em. Professor an der Technischen Hochschule in Karlsruhe.

Band II: Synchronmaschinen und Einankerumformer

Berichtigte und ergänzte Neuauflage. 724 Seiten mit 519 Figuren und umfangreichen Ergänzungen.

«Das Buch zeichnet sich vor allem durch eine vor keiner Schwierigkeit zurückschreckende Genauigkeit aus, welche jetzt, wo Einzelleistung und Baustoffbeanspruchung der Maschinen den erreichbaren Grenzen zustreben, eine immer zunehmende Berechtigung erhält. Es wird daher den bauenden Techniker bei Behandlung derartiger Grenzprobleme vor unliebsamen Überraschungen bewahren.» (*Elektr. und Maschinenbau*)

Experientia Supplementum I

Symposium on Present Problems in Nutritions Research
Symposium über Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung
Symposium sur les problèmes actuels de la nutrition

Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences – Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften – Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition. Ca. 300 Seiten, ca. Fr. 36.–.

Verlangen Sie ausführliche Prospekte vom

VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL / STUTTGART